P. 4228

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

VOL. 15
1986

C.N.R.A.
30 OCT. 1987
UNITE CENTRALE
VERSAILLES

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-15

COMPTE RENDU ANNUEL DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

(Vol. 15, 1986)

S O M M A I R E

Première partie : COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

I - BIOCHIMIE GENERALE ET COMPAREE 9

A - REGULATION HORMONALE ET METABOLISME DE L'ABEILLE 10

Action de l'AMPc et du glucagon sur la glycémie et la lipémie de l'Abeille. Interaction de la somatostatine 10

Action des agonistes et antagonistes aminergiques sur la lipémie de l'Abeille 26

Synthèse : Colloque 44

B - ENZYMOLOGIE THEORIQUE ET EXPERIMENTALE 44

1 - Analyse cinétique des enzymes non michaëliennes inhibables par leurs substrats 44

2 - Equations d'activation enzymatique 47

3 - Interactions hormones/enzymes 57

4 - Le substrat peut-il "créer" l'enzyme ? 62

C - LOCALISATION DE L'ACIDE AZELAIQUE DANS LE CERCEAU DE L'ABEILLE 77

D - ETUDE DES ACETYLCHOLINESTERASES DE L'ABEILLE 81

II - BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE ET CRYPTOTOXICOLOGIQUE 83

- Concept de cryptotoxicologie 83

- Etude biochimique de l'action de la toxine du BTi chez le Moustique 85

- Action comparée du jeûne et d'une rickettsiose au niveau des glucides et des lipides du grillon 102

- Lutte biochimique spécifique contre le Varroa jacobsoni

parasite de l'abeille 103

III - BIOCHIMIE TRAUMATOLOGIQUE VEGETALE 109

A - Etude de la résistance des Pins sylvestres aux attaques des Scolytes et de leurs champignons associés 109

B - Interactions pathologiques avec la Photosynthèse chez Capsicum annuum infesté par Phytophthora capsici 120

IV - PROJETS DE RECHERCHES 123

1 - Protection de l'abeille contre le Varroa et contre l'action des Pesticides 123

2 - Intervention de dérivés phénoliques dans la résistance des Végétaux aux Parasites et aux Pathogènes ... 131

3 - Etude biochimique de l'action de la toxine du BTi chez le moustique 132

4 - Localisation et mode d'action biochimique des acides azélaïque et pimélique chez l'abeille isolée 132

5 - Enzymologie théorique et expérimentale 132

6 - Régulation enzymatique et hormonale de la glycémie de l'abeille 133

7 - Ecotoxicologie moléculaire chez l'abeille 134

Deuxième partie : ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

INTRODUCTION 143

PROGRAMME D'ENZYMOLOGIE 143

PROGRAMME DE TOXICOLOGIE 144

PROGRAMME DE STATISTIQUES BIOLOGIQUES 144

II - ACTIVITES ANNEXES

- Nomination F.I.S.A.C. 145

- Conseil Scientifique PNRL 145

- Promotion de la langue française scientifique 145

- Missions à l'Etranger. 146

Troisième partie : COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - BILAN BUDGETAIRE 1986 147

II - EFFECTIFS DU LABORATOIRE 148

III - PERSPECTIVES 1987 148

Quatrième partie : PUBLICATIONS, COLLOQUES, THESES

I - LISTE DES PUBLICATIONS PARUES EN 1986 153

II - RECAPITULATIONS DES COMMUNICATIONS EN COLLOQUES 154

III - SOUTENANCES DE THESES 155

C'est de groupes restreints, exclus sinon
persécutés par le reste de la société, que sont
venues certaines des innovations qui ont bouleversé
cette société : puissance innovatrice de groupes
minoritaires caractérisés par une situation
marginale par rapport aux circuits dominants"
Prigogine et Stengers, 1986, Gallimard, p. 245

Première Partie

COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

Les travaux du laboratoire de Biochimie, pour l'année 1986, s'inscrivent comme précédemment parmi les objectifs suivants, définis dans le document de programmation de la recherche au sein du département de phytopharmacie et d'écotoxicologie :

1er objectif : "Développer la chimie et la physicochimie des produits agropharmaceutiques et anthropogéniques (pesticides, polluants, médiateurs chimiques".

2ème programe (1-2) - "Etude des molécules originales agissant sur les cibles encore peu explorées, ou modifiant soit le développement, soit le comportement des ravageurs".

2ème objectif : "Améliorer l'utilisation des produits agro-pharmaceutiques grâce à une meilleure connaissance de leur mode d'action et de leur comportement".

1er programme (2-1) - "Mode d'action physiologique et biochimique des produits agro-pharceutiques, et étude des phénomènes de résistance".

3ème objectif : "Apprécier les risques toxicologiques à court, moyen et long terme induits par les produits agro-pharmaceutiques sur les espèces animales domestiques et sauvages".

3ème programme (3-3) - "Appréciation des effets non intentionnels des pesticides sur les organismes auxiliaires de l'agriculture".

Aucune recherche finalisée ne pouvant se soustraire à la nécessité de s'appuyer sur des connaissances fondamentales, les travaux du laboratoire ont continué, comme par le passé, à développer parallèlement ces deux aspects : ainsi, les recherches sur la biochimie générale et toxicologique de l'abeille se rattachant aux objectifs n°1 et 3, tandis que celles orientées vers la biochimie végétale sont plutôt reliées à l'objectif n°2. Les aspects enzymologiques fondamentaux, malgré leur caractère actuel assez théorique, sont destinés à déboucher, également, directement, sur l'étude du mode d'action de substances agrochimiques chez l'abeille et chez des végétaux (dans ce dernier cas, en relation avec l'action de stimulants de résistance). Enfin, les travaux engagés pour la lutte contre le Varroa visent précisément une cible non explorée relevant du 2e programme/1er objectif.

Les collaborations extérieures se sont poursuivies et étendues, en particulier avec les partenaires suivants :

en France : Université d'Avignon, Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales : Prof. Ph. J. Coulomb.

Université de Bordeaux, Laboratoire de Physiologie de l'Insecte : Métabolisme : Prof. J. Dutrieu, DRS. R. Moreau et L. Gourdoux.

à l'étranger : Yougoslavie : Université de Belgrade : Chaire/Dépt. de Biologie, Fac. Méd. Vétér. : Prof. D.S. Popeskovic

Allemagne : Université de Ulm. Institut de Chimie clinique : Prof. V. Maier.

I - BIOCHIMIE GENERALE ET COMPAREE

INTRODUCTION

Les recherches entreprises depuis 1974 sur la régulation enzymatique et hormonale de la glycémie et de la lipémie de l'abeille se poursuivent sous l'angle fondamental, avec l'étude comparée de l'action de l'AMPc et du glucagon, ainsi qu'une analyse de l'interaction "croisée" des hormones aminergiques et peptidergiques avec le propranolol et la somatostatine. Les travaux antérieurs sur le mode d'action des agonistes et antagonistes adrénergiques sur la glycémie ont été, par ailleurs, publiés et complétés avec une étude du mode d'action de l'octopamine, qui sera poursuivie en 1987. Une synthèse de l'ensemble des travaux effectués au cours des dernières années a été présentée au Colloque International de Bordeaux. La collaboration avec l'Université de Bordeaux s'est matérialisée à travers deux thèses et une publication sur l'interaction moléculaire directe entre hormones et enzymes simultanément actives sur la glycémie;

la poursuite de ce travail nécessite l'approfondissement des notions théoriques sur les diverses formes d'activation enzymatique. Toujours dans le domaine enzymatique, les bases théoriques nécessaires à l'interprétation des cinétiques d'enzymes non michaëliennes inhibables par excès de leurs substrats ont été établies. Enfin, l'exploration des voies par lesquelles un substrat pourrait agir sur la structure associative de l'enzyme correspondante a été poursuivie et a fait l'objet d'une conférence à l'Université de Belgrade, à l'occasion du cinquantenaire de la création de la faculté de Médecine Vétérinaire. Les recherches sur la structure des acétylcholinestérases de la tête de l'abeille ont été engagées dès le premier trimestre.

Les travaux relatifs au mode d'action des "survivones" chez l'abeille se sont poursuivis et la présence des acides azélaïques et pimélique dans le cerveau de l'abeille a été analysée au moyende

techniques chromatographiques quantitatives mises au point à cet effet.

A - REGULATION HORMONALE DU METABOLISME DE L'ABEILLE.

BIOCHIMIE GÉNÉRALE. — *Analogie d'action de deux effecteurs hyperglycémiants : l'AMP cyclique et le glucagon, injectés chez l'Abeille in vivo.* Note de **Michel Bounias,** présentée par Jean Roche.

L'AMP cyclique et le glucagon injectés respectivement à des Abeilles ouvrières naissantes entraînent l'apparition de deux pics hyperglycémiques successifs dont les maximums se situent vers 45 et 135 mn après l'injection. Dans le cas du tréhalose, le premier pic est le plus prononcé sous l'action de l'AMPc, tandis que le second l'est davantage dans le cas de l'injection de glucagon. Les pics du glucose sont, en revanche, de même amplitude avec chacun de ces effecteurs. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse du rôle possible de l'AMPc comme second messager dans les processus de régulation de la glycémie de l'Abeille.

GENERAL BIOCHEMISTRY. — Analogous effects of two hyperglycemic factors: cAMP and glucagon, injected to honeybees *in vivo.*

Injecting emerging worker honeybees with cAMP or glucagon elicits two successive hyperglycemic peaks with maxima occurring similarly at 45 and 135 min. after injections. In the case of trehalose, the first peak is the most marked under cAMP action, whereas the second is the most pronounced following glucagon injection. Both glucose peaks are, however, of similar amplitude following the action of each of these effector. These results are consistent with the hypothesis of the possible role of cAMP as "second messenger" in the regulation of honeybees glycemia.

INTRODUCTION. — La présence d'analogues immunologiques du glucagon dans le corps de l'Abeille et l'activité hyperglycémiante du glucagon de Porc injecté chez ce même Insecte *in vivo* ont été démontrées presque simultanément ([1], [2], [3]). Or, chez les Vertébrés, la libération de glucagon agit par l'intermédiaire d'une décharge d'AMP cyclique [4] considéré, alors, comme « second messager ». D'autre part, la présence de protéines kinases activables par l'AMP cyclique a été démontrée chez le Criquet [5] et chez la Mouche des fruits [6], ce qui suggère l'hypothèse que l'AMP cyclique pourrait être, également chez l'Insecte, le médiateur d'un système glycogénolytique analogue à celui des Vertébrés. Il nous a donc paru intéressant d'étudier, d'une part, les effets de l'injection d'AMP cyclique sur la glycémie de l'Abeille *in vivo*, et de les comparer, d'autre part, à ceux provenant de l'action de l'injection de glucagon de Porc, compte tenu de ce que la purification d'une quantité de glucagon endogène d'Abeille suffisante pour permettre l'analyse n'a pas encore été achevée.

MÉTHODES. — Les Abeilles (*Apis mellifera, mellifera* L.) ont été prélevées au stade d'adultes ouvrières naissantes, dans les alvéoles encore operculés. Au cours de la série d'expériences décrites, 200 abeilles d'un poids moyen individuel de $122{,}6 \pm 1{,}9$ mg ont été utilisées. Les injections ont été opérées comme précédemment [3]. L'AMP cyclique (AMPc) a été administré sous forme de dibutyrate à raison de 2 nmoles par Abeille, et le glucagon de Porc à raison de 400 ng soit 0,1 nmole par individu, l'un et l'autre dans un volume de 0,5 µl de soluté physiologique composé comme suit : KCl 20 mM + NaCl 5 mM + HCl, QSP pH 6,8. L'hémolymphe est recueillie au bout de 10 mn puis à intervalles de 45 mn pendant une période de 3 h, au cours de laquelle les Abeilles sont maintenues à 21 ± 1°C à l'obscurité afin d'éviter toutes modifications de la glycémie pouvant résulter de leur agitation, à la lumière. Les glucides sont analysés selon les techniques nanochromatographiques décrites ailleurs ([7], [8], [9]). Des lots de 9 abeilles sont utilisés pour chaque durée d'incubation après injection de chacun des effecteurs. Les probabilités de signification attachées aux comparaisons de moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélations sont calculées d'après l'équation de « *t* » de Student.

RÉSULTATS. — La figure 1 présente les variations de la tréhalosémie et de la glucosémie obtenues après injections d'AMPc, ainsi que les valeurs témoins résultant de l'injection de soluté physiologique. Trois séries d'expériences témoins ont été réalisées, avant, pendant, et après les injections d'hormones. L'AMP cyclique provoque une élévation de la tréhalosémie immédiatement après injections : les différences au temps ($T_0 + 10$ mn)

0249-6313/86/03020141 $2.00 © Académie des Sciences

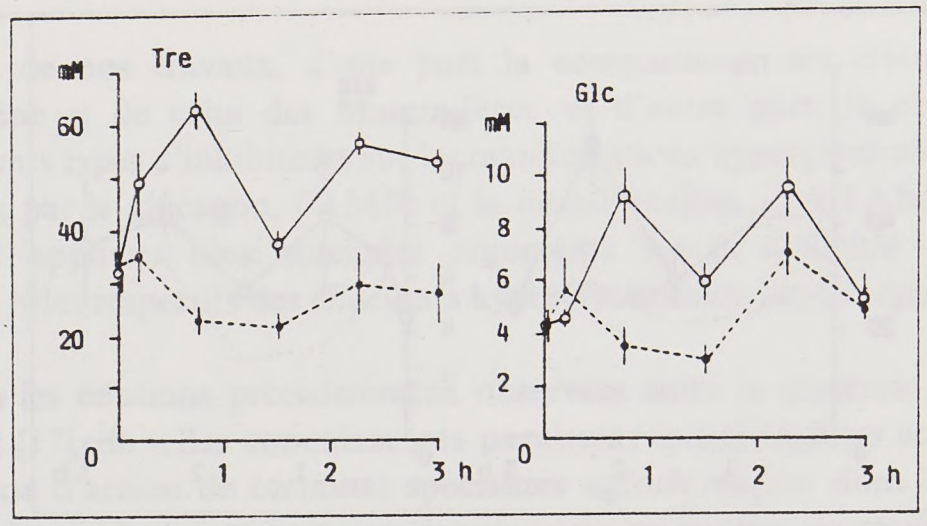


Fig. 1. — Variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc) d'Abeilles ouvrières naissantes après injection de dibutyrate d'AMP cyclique (—○—) ou de soluté physiologique (---●---). Les moyennes et les écarts-types (traits verticaux) ont été calculés d'après N = 3 mesures.

Fig. 1. — Variations of the haemolymph levels of trehalose (Tre) and glucose (Glc) in emerging worker honeybees following injection of dibutyryl cAMP (—○—) or saline (---●---). Means ±S.D. (vertical bars) were calculated from N = 3 determinations.

sont déjà significatives relativement à la tréhalosémie initiale ($p = 0{,}04$) quoiqu'elles ne le soient pas encore relativement à la valeur mesurée 10 mn après injection de soluté physiologique ($p = 0{,}1$). Le pic observé à 45 mn (+93 %) ($p < 0{,}000\,2$) est suivi d'un retour à la normale ($p > 0{,}09$) au bout de 90 mn, où, cependant, les valeurs mesurées restent supérieures à celles des témoins ($p = 0{,}001$). Un second pic se manifeste au bout de 2 h 15 mn et reste significatif 3 h après injections ($p < 0{,}004$). Son amplitude (+76 %) est toutefois significativement inférieure à celle du précédent ($p = 0{,}014$).

La glucosémie n'augmente qu'à partir de 45 mn (+115 %) ($p < 0{,}01$), puis passe, comme la tréhalosémie, par un retour vers la valeur initiale à 90 mn ($p = 0{,}08$), tout en restant supérieure à celle des témoins correspondants ($p = 0{,}01$). Un second pic (+120 %) est également observé au bout de 2 h 15 mn ($p = 0{,}008$) : il convient, toutefois d'observer qu'une telle remontée, entre 90 et 135 mn, se produit aussi bien sous l'action de l'AMPc qu'après injection de soluté physiologique, ce qui peut apparaître comme le signe d'un mécanisme commun. La différence observée à 135 mn entre les lots ayant reçu de l'AMPc et les témoins n'est, d'ailleurs, plus significative ($p = 0{,}12$), et cette convergence aboutit à des valeurs numériques pratiquement identiques 3 h après injections.

La figure 2 présente les variations de la tréhalosémie et de la glucosémie après injection de glucagon. Comme dans le cas de l'action de l'AMPc, deux pics successifs apparaissent respectivement à 45 et 135 mn. En ce qui concerne le tréhalose, cependant, l'amplitude du premier (+24 %) est, au contraire, moins importante ($p = 0{,}06$) que celle du second (+65 %) ce qui confirme nos résultats antérieurs [2]. L'augmentation de la tréhalosémie est déjà significative à 10 mn par comparaison avec la valeur initiale ($p = 0{,}04$) mais elle ne l'est pas relativement à celle des témoins correspondants ($p = 0{,}25$) à laquelle elle ne devient supérieure qu'à 45 mn ($p = 0{,}001$). Le pic du tréhalose observé à 2 h 15 mn est significatif à la fois vis-à-vis de la teneur initiale ($p = 0{,}014$) et de celle des témoins pris au même temps ($p = 0{,}034$). Un retour vers la normale se produit, dans les deux cas, après 3 h.

L'augmentation de la glucosémie n'est significative, aux temps 10 mn (+45 %), 45 mn (+83 %) et 2 h 15 mn (+82 %) que relativement aux valeurs initiales ($p = 0{,}09$; $p = 0{,}075$ et $p = 0{,}010$ respectivement) bien qu'elle le soit à 90 mn par rapport aux témoins

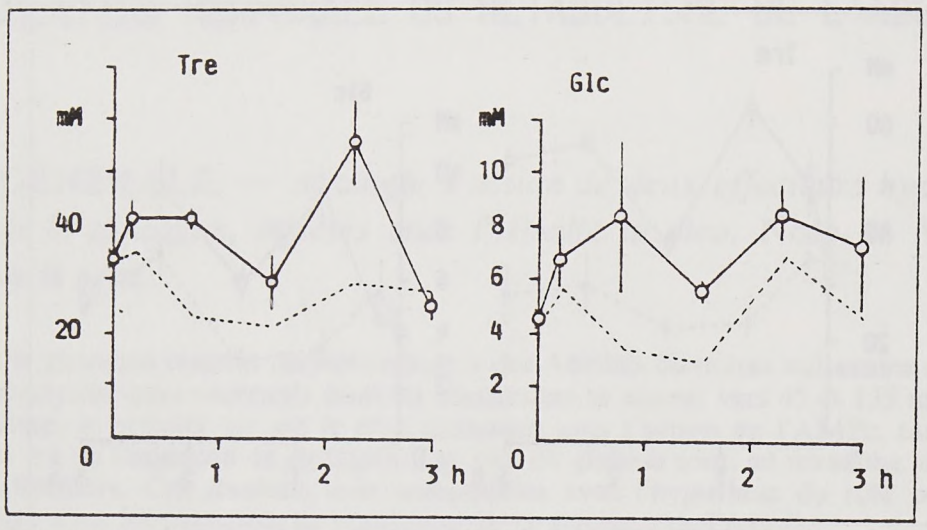


Fig. 2. — Variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc) d'Abeilles ouvrières naissantes après injection de glucagon de Porc (—○—) ou de soluté physiologique (-----). Les moyennes et les écarts-types (traits verticaux) ont été calculés d'après N = 3 mesures.

Fig. 2. — Variations of the haemolymph levels of trehalose (Tre) and glucose (Glc) in emerging worker honeybees following injection of porcine glucagon (—o—) or saline (-----). Means ± S.D. (vertical bars) were calculated from N = 3 determinations.

($p = 0{,}002$), ceci en raison d'une diminution des écarts-types observés. En revanche, les variations de la glycémie consécutives à l'injection du glucagon sont en corrélation plus étroite avec celles dues à l'AMPc dans le cas du glucose ($\rho = 0{,}812$; $P_{(\rho)} = 0{,}05$) que dans celui du tréhalose ($\rho = 0{,}50$; $P_{(\rho)} = 0{,}31$) : ceci provient de l'inversion, chez ce dernier, des proportions respectives des pics à 45 et 135 mn sous l'action des deux effecteurs (*fig.* 1 et 2).

Enfin, une certaine analogie entre l'action des effecteurs hormonaux et celle de l'injection de soluté physiologique apparaît de nouveau à l'observation des graphiques (*fig.* 1 et 2). Toutefois, cette remarque n'est étayée ni dans le cas du glucagon, ni dans celui de l'AMPc par les calculs de corrélations, dont aucun ne donne de coefficient significatif.

Discussion et conclusions. — Si la présence, chez les Insectes, d'hormones peptidiques hyperglycémiantes a été suggérée depuis près de 20 ans [10], ce n'est que bien plus tard que la présence d'analogues radio-immunologiques du glucagon a été signalée, d'abord chez *Manduca sexta* [11]. La mise en évidence d'une sensibilité de certains sites récepteurs de l'Abeille à l'action du glucagon de Vertébrés est étayée par l'isolement de cet Hyménoptère, d'un peptide hyperglycémiant [12] et par la récente description de la présence, dans son cerveau, d'analogues immunologiques du glucagon [13].

Le mode d'action du glucagon paraît différer de celui des adrénergiques [14] en ce qu'il manisfeste son maximum d'intensité au bout d'un temps plus long. Or, il a été montré, que, chez les Vertébrés, un inhibiteur des récepteurs β adrénergiques bloque l'action de l'adénylate cyclase [15], tandis que, chez l'Abeille, un autre β-bloquant, le propranolol, neutralise l'hyperglycémie induite par la noradrénaline injectée *in vivo* [16]. Il est donc particulièrement intéressant de constater, maintenant, que l'action chez l'Abeille du glucagon de Vertébrés provoque des effets très comparables à ceux résultant de l'injection d'AMPc. La réponse est plus intense à plus court terme, dans ce dernier cas, ce qui serait compatible avec l'intervention de l'AMPc comme second messager : son administration provoquerait, en effet, une réponse plus directe que celle du glucagon de Porc, lequel, par ailleurs, peut présenter certaines différences d'ordre phylogénique avec le glucagon endogène d'Abeille. Nous nous proposons donc de décrire, dans les

étapes suivantes de nos travaux, d'une part la comparaison des effets respectifs du glucagon endogène et de celui des Mammifères, et d'autre part, la confrontation de l'action de différents types d'inhibiteurs sur les manifestations hyperglycémiques respectivement provoquées par le glucagon, l'AMPc et la noradrénaline, chez l'Abeille. Il nous est permis d'espérer apporter ainsi quelques arguments sur la question épineuse de la comparaison des rôles respectifs des effecteurs hyperglycémiants peptidergiques et adrénergiques.

Étant données les relations précédemment observées entre la glycémie des Abeilles et leur productivité [17], de telles connaissances paraissent indispensables comme préalable à l'étude du mode d'action de certaines spécialités agrochimiques dont les effets « non intentionnels », chez l'Abeille, constituent, depuis quelques années, un grave sujet d'inquiétude, aussi bien parmi les agriculteurs que chez les apiculteurs.

Remise le 16 décembre 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] V. MAIER, G. WITZNICK, R. KELLER et E. F. PFEIFFER, *Acta Endocrinol.*, 87, Suppl. 215, 1978, p. 69-70.

[2] M. BOUNIAS, *C.R. Ann. Lab. Biochimie*, 7, 1978, p. 41-43.

[3] M. BOUNIAS et H. PACHECO, *Comptes rendus*, 289, série D, 1979, p. 201-204.

[4] J. H. EXTON, A. D. CHERRINGTON, N. J. HUTSON et F. D. ASSIMACOPOULOS-JEANNET, *Glucagon: Its Role Physiol. Clin. Med.*, P. F. FOA éd., Springer, N.Y., p. 321-347.

[5] W. J. A. VAN MARREWIJK, A. T. M. VAN DEN BROECK et A. M. T. BEENAKKERS, *Insect Biochem.*, 10, 1980, p. 675-679.

[6] J. L. GARCIA, A. HARO et A. M. MUNICIO, *Arch. Biochem. Biophys.*, 220, 1983, p. 509-518.

[7] M. BOUNIAS, *Analusis*, 4, 1976, p. 87-93.

[8] M. BOUNIAS, *Analyt. Biochem.*, 106, 1980, p. 291-295.

[9] M. BOUNIAS, *L'Analyse Biochimique quantitative par Nanochromatographie en couche mince*, Masson, Paris, 1983, 205 p.

[10] A. W. WIENS et L. I. GILBERT, *J. Insect Physiol.*, 13, 1967, p. 779-794.

[11] H. S. TAGER, J. MARKESE, R. D. SPIERS et K. J. KRAMER, *Nature (London)*, 254, 1975, p. 707-708.

[12] M. D. VAN NORSTRAND, J. B. CARLSEN, L. JOSEFSSON et W. S. HERMAN, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 42, 1980, p. 526-533.

[13] V. MAIER, D. GRUBBE, R. STEINER, A. GREISCHEL et D. PFEIFFER, *The New Frontier*, Abstr. Symp. Int. "Brain-Gut Axis", Florence, p. 19.

[14] M. BOUNIAS et H. PACHECO, *Comptes rendus*, 289, série D, 1979, p. 33-36.

[15] J. W. KUSIAK et J. PITHHA, *Biochemical Pharmacol.*, 33, 1984, p. 483-485.

[16] M. BOUNIAS, *C.R. Soc. Biol.*, 179, 1985, p. 218-223.

[17] M. BOUNIAS, *J. Apic. Res.*, 20, 1981, p. 215-220.

I.N.R.A., Laboratoire de Biochimie, C.R.A. d'Avignon, 84140 *Montfavet.*

C. R. Soc. Biol., 1986, *180*, 77-88.

Biochimie comparée.

Modifications de la lipémie de l'Abeille sous l'action de l'AMP cyclique et du glucagon injectés *in vivo*, seuls ou en présence de somatostatine

par MICHEL BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, INRA, C. R. d'Avignon, BP 91, F84140 Montfavet.

(reçue le 13 janvier 1986).

Summary. — Emerging worker honeybees were injected *in vivo* with 0.5 nmol cAMP (dibutyrate), 0.1 nmol glucagon, either alone or in presence of 0.2 nmol of somatostatin (vertebrate origin), and saline alone. cAMP increases the haemolymph levels of phospholipids and decreases those of triacylglycerols, whereas fatty acids are poorly affected and steroids and diacylglycerol concentrations exhibit oscillations about a mean value close to the initial level. Glucagon shows similar effects as cAMP in the case of triacylglycerol from 10 min to 3 hrs following injections and, in the case of steroids and diacylglycerols, from 10 min to 1 hr 30 min. The hypothesis of the role of cAMP as a « second messenger » of glucagon thus emerges rather in these particular cases. Somatostatin injected together with each of the other 2 hormones replaces their effects by its own hypolipemic activity, except for cAMP action on fatty acids and glucagon action on triacylglycerols. In both of these last cases, the respective effects of somatostatin and each of the other 2 hormones are mutually wiped out, and the resulting lipid variations are identical to those resulting from the injection of saline, i. e. from the release of various endogenous hormones. These last ones show similar effects as cAMP again in the case of steroids and diacylglycerol from 45 min to 3 hrs after injections.

Résumé. — Des abeilles ouvrières naissantes ont reçu, par injection *in vivo*, 0,5 nmole d'AMPc (dibutyrate) ou 0,1 nmole de glucagon, purs ou en mélange avec 0,2 nmole de somatostatine, ainsi que le soluté physiologique seul. L'AMPc entraîne une augmentation de la concentration des phospholipides dans l'hémolymphe et une diminution de celle des triglycérides, alors que les acides gras sont peu affectés et que les stéroïdes et les diglycérides oscillent autour d'une moyenne comparable à la valeur initiale. L'action du glucagon ressemble à celle de l'AMPc dans le cas des triglycérides, de 10 mn à 3 h après injection, et dans le cas des stéroïdes et des diglycérides, de 10 mn à 1 h 30. L'hypothèse d'un rôle de l'AMPc comme second messager du glucagon apparaît donc plutôt dans ces deux cas particuliers. La somatostatine, injectée en mélange avec chacune des deux autres hormones, neutralise

leurs effets et leur substitue son activité hypolipémiante, à deux exceptions près : celle de l'AMPc vis-à-vis des acides gras et celle du glucagon vis-à-vis des triglycérides. Dans les deux cas, les actions respectives de la somatostatine et des deux autres hormones paraissent s'annuler mutuellement, de sorte que l'effet résultant est identique à celui que produit l'injection de soluté physiologique : celle-ci se traduit précisément par diverses décharges hormonales endogènes dont le résultat est comparable à celui de l'AMPc, de nouveau dans le cas des stéroïdes et des diglycérides, de 45 mn à 3 h après injection.

La présence d'adénylate-cyclase chez les Insectes est connue depuis assez longtemps déjà (1) et chez l'Abeille, il a été récemment montré que l'injection d'AMP cyclique entraîne une réaction hyperglycémique présentant de grandes analogies avec celle consécutive à l'injection de glucagon de Vertébrés (2). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le Rat par Exton et coll. (3) qui ont montré, dans des cellules du foie, que le glucagon provoque une rapide accumulation d'AMP cyclique, considéré comme « second messager ». Ce dernier ne serait pas affecté par l'action de l'adrénaline sur les α-récepteurs, tandis qu'une légère et courte augmentation serait obtenue par l'intermédiaire des β-récepteurs. Or, si les effets de ces hormones ont été particulièrement étudiés au niveau de la glycogénolyse, il est établi, par ailleurs, que le glucagon et l'AMPc agissent sur la biosynthèse des lipides (4). Spencer et Candy (5) avaient même, dès 1976, mis en évidence une similarité d'action de l'AMPc et de l'hormone lipotrope d'Insectes, chez le Criquet *Schistocerca gregaria* : ces deux facteurs provoquaient la libération de diglycérides sans, toutefois, que les triglycérides-lipases soient activées. En revanche, Hadivanova et Georgiev (6) estiment que l'action de l'insuline et de l'adrénaline sur les triglycérides-lipases du rein se manifeste par l'intermédiaire des concentrations intracellulaires d'AMPc, ce qui est à rapprocher de l'augmentation des concentrations en glycérol libre observée lors de l'accumulation d'AMPc chez le Rat (7). D'autre part, toujours chez le Rat, Pry et Porter (8) ont récemment suggéré que le glucagon et l'AMPc agissent tous deux sur le métabolisme des acides gras en diminuant la quantité de synthétase traductible par ARNm.

Ces divers éléments nous ont incité à analyser comparativement les effets de l'AMPc et ceux du glucagon sur la dynamique des concentrations des principales classes de lipides dans l'hémolymphe d'Abeille.

Compte tenu de la mise en évidence récente de l'action hypoglycémiante de la somatostatine (9) de vertébrés, chez l'Abeille, il nous a également paru intéressant d'analyser l'interaction possible de ce facteur hormono-régulateur avec les effets respectifs de l'AMPc et du glucagon.

Animaux et techniques. — Les abeilles ouvrières (*Apis mellifera, mellifera* L.), au stade adultes naissantes, ont été prélevées dans les alvéoles encore operculés, quelques instants avant leur émergence natu-

relle. Au cours de l'ensemble des expériences, 550 individus, d'un poids moyen de 123,7 ± 2,1 mg, ont été utilisés. Le glucagon extrait du Porc, l'AMPc sous forme de dibutyrate, et la somatostatine sont préparés dans le soluté physiologique déjà décrit (2) et les solutions injectées à raison de 0,5 µl par individu. Les doses administrées à chaque abeille sont les suivantes : glucagon : 400 ng (0,1 nmole); AMPc : 0,5 nmole; somatostatine cyclique : 360 ng (0,2 nmole). Des injections de soluté physiologique ont été effectuées au début et à la fin de la série expérimentale, à titre de témoins. Aussitôt après les injections, effectuées par lots de 10 individus pour chaque traitement, les abeilles sont placées à l'obscurité à 24 ± 1° C. Les prélèvements d'hémolymphe sont effectués au voisinage de l'aorte dorsale à l'aide de microseringues, avant injection puis aux temps 10 mn, 45 mn, 1 h 30, 2 h 15, et 3 h, et l'analyse des lipides est conduite comme précédemment (9, 10) par nanochromatographie quantitative en couche mince. La précision de la technique est de l'ordre de ± 6 %. Les probabilités de signification associées aux comparaisons de moyennes, aux analyses de variance et aux valeurs des coefficients de corrélations sont calculées à partir de l'équation de la distribution de « t » de Student. Les paramètres de régression linéaire sont désignés par b (pente) et a (ordonnée à l'origine). Les moyennes et les écarts-types sont calculés à partir de N = 3 mesures pour les injections d'hormones et N = 6 mesures dans le cas des témoins.

Résultats. — Le tableau I indique les valeurs moyennes de la lipémie initiale des lots d'abeilles, juste avant les injections. La variabilité résulte de l'inévitable étalement, dans le temps, des prélèvements dans la ruche. Elle n'affecte, cependant, les réponses relatives (C/Co) que dans des limites négligeables. Les fractions d'acides gras et de triglycérides décelées en plus grandes quantités, au cours des expériences décrites, correspondent aux catégories moyennes, de longueur de chaînes voisine de C16 à C18 (10).

Les variations de concentration en composés de la classe des phospholipides (PL) sont indiquées sur la figure 1A. Au cours des 3 heures qui suivent l'injection d'AMPc, les concentrations en phospholipides oscillent autour d'une moyenne supérieure de 32 % à la valeur initiale. Les aug-

TABLEAU I. — Valeurs moyennes de la lipémie initiale des lots d'abeilles pour l'ensemble des 6 séries expérimentales décrites.

Composés	$\bar{x}$	(Sx)	Composés	$\bar{x}$	(Sx)
Phospholipides	2,62	(0,65)	Diglycérides 1-2	0,10	(0,04)
Stéroïdes	0,15	(0,05)	Diglycérides 1-3	0,04	(0,01)
Acides gras	0,05	(0,02)	Triglycérides	0,015	(0,003)

Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (Sx) sont exprimés en mM.

mentations par rapport aux témoins sont significatives à 45 mn ($P = 0,006$) et 135 mn ($P = 0,02$), ces derniers oscillant autour d'une valeur moyenne inférieure de 17 % à la valeur initiale. L'injection simultanée de somatostatine élimine l'effet de l'AMPc : les valeurs moyennes se situent alors au niveau le plus bas, soit 48 % au-dessous des valeurs initiales : elles restent constamment inférieures à celles des témoins, comme le confirme l'analyse de variance par la méthode des couples ($P = 0,02$).

Le glucagon entraîne également deux pics, dont le premier ($P = 0,01$) se produit après 45 mn, comme dans le cas de l'AMPc, tandis que le second ($P = 0,26$) est retardé à 3 heures après injection. La valeur moyenne mesurée au cours des 3 heures qui suivent les injections, oscille autour d'une valeur moyenne identique à la valeur initiale (+ 0,2 %), et l'injection simultanée de somatostatine élimine, comme précédemment, les augmentations provoquées par l'hormone : la valeur moyenne,

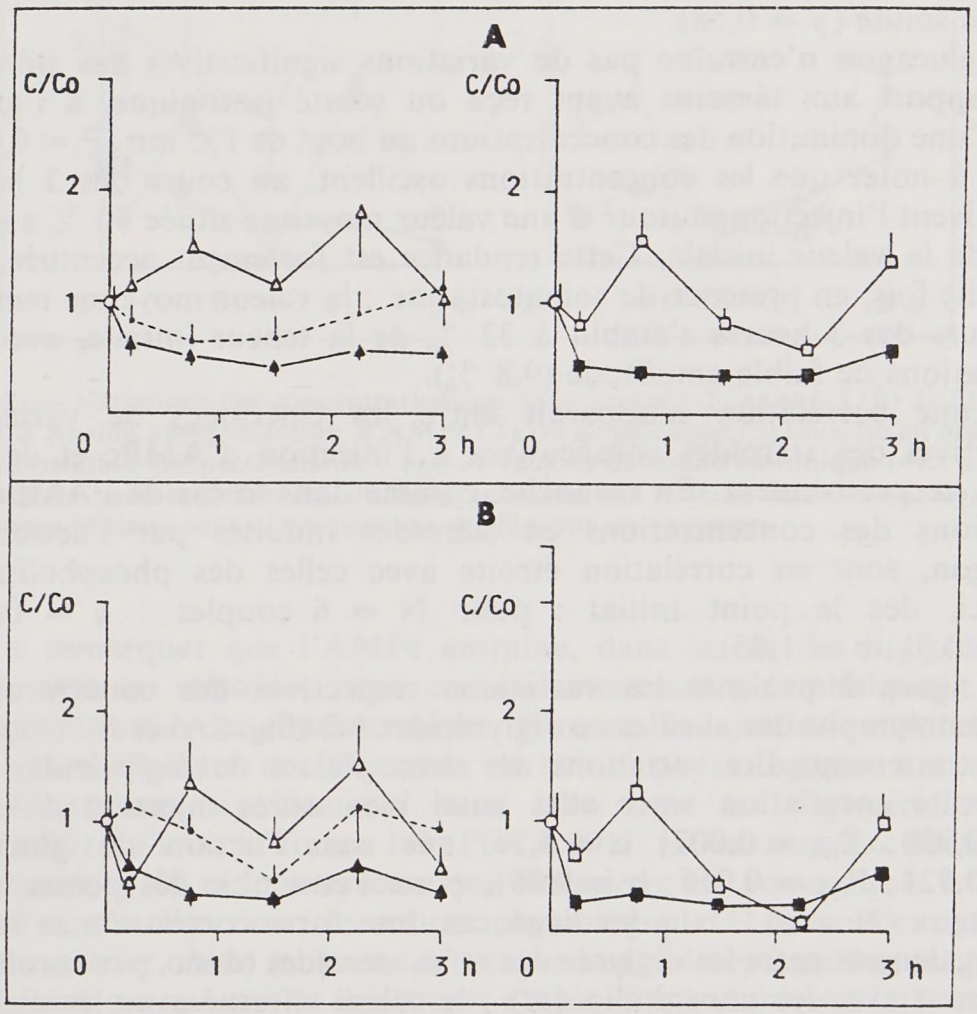


FIG. 1. — Variations des concentrations en phospholipides (A) et stéroïdes (B) de l'hémolymphe d'Abeille après injection d'AMPc (△) ou de glucagon (□) seuls ou en présence de somatostatine [respectivement : (▲) et (■)], et de soluté isotonique (- - - ● - - -). Les résultats sont exprimés en données relatives aux valeurs initiales (C/Co). Les écarts-types initiaux sont identiques aux coefficients de variation.

au cours des 3 heures consécutives au traitement, est abaissée de 60 % par rapport aux valeurs initiales. La méthode des couples confirme la signification de cette dépression par comparaison avec les témoins ($P = 0,01$).

Les variations des concentrations en stéroïdes sont présentées sur la figure 1B. L'AMPc entraîne, 10 mn après injections, une brève diminution (− 55 %) par rapport aux valeurs initiales; la différence avec les témoins est significative au seuil $P = 0,02$. Les oscillations se situent autour d'une moyenne comparable aux valeurs initiales (− 7 %) avec l'hormone pure, mais de nouveau fortement abaissée en présence de somatostatine (− 56 %). Ici encore, la distribution des points expérimentaux se situe de manière significative au-dessous de celle des témoins ($P = 0,02$). Il est intéressant de noter qu'à partir de 45 mn après injection, l'action de l'AMPc ne se différencie plus de celle du sérum : elle présente une corrélation élevée avec les variations des phospholipides ($N = 4$ couples : $\rho = + 0,973$; $P_{(\rho)} = 0,03$; $b = 1,21$) et, une autre, quoique plus faible, avec celles des stéroïdes survenant après injection de soluté ($\rho = 0,58$).

Le glucagon n'entraîne pas de variations significatives des stéroïdes par rapport aux témoins ayant reçu du soluté isotonique, à l'exception d'une diminution des concentrations au bout de 135 mn ($P = 0,002$). Il est à noter que les concentrations oscillent, au cours des 3 heures qui suivent l'injection, autour d'une valeur moyenne située 30 % au-dessous de la valeur initiale. Cette tendance est fortement accentuée, une nouvelle fois, en présence de somatostatine : la valeur moyenne mesurée au cours des 3 heures s'établit à 33 % de la teneur initiale, avec des fluctuations de faible amplitude (9,8 %).

Aucune corrélation n'apparaît entre les cinétiques de variations respectives des stéroïdes consécutives à l'injection d'AMPc et de glucagon, respectivement. En revanche, comme dans le cas de l'AMPc, les variations des concentrations en stéroïdes induites par l'action du glucagon, sont en corrélation étroite avec celles des phospholipides, et ceci, dès le point initial : pour $N = 6$ couples : $\rho = 0,957$; $P_{(\rho)} = 0,01$; $b = 1,05$).

La figure 2 présente les variations respectives des concentrations de l'hémolymphe des abeilles en diglycérides 1-2 (Fig. 2A) et 1-3 (Fig. 2B) après traitement. Les variations des deux classes de diglycérides sont en étroite corrélation entre elles aussi bien après injection d'AMPc ($\rho = 0,930$; $P_{(\rho)} = 0,007$; $b = 1,35$) que sous l'action du glucagon ($\rho = 0,921$; $P_{(\rho)} = 0,015$; $b = 0,89$), pour l'ensemble des points expérimentaux ($N = 6$). Dans les deux cas, une forte corrélation se manifeste également entre les diglycérides et les stéroïdes (donc, par corollaire, également avec les phospholipides) : le calcul effectué avec les diglycérides 1-2 (fraction la plus abondante) donne les résultats suivants, pour $N = 6$ couples :

— avec l'AMPc : $\rho = 0,925$; $P_{(\rho)} = 0,008$; $b = 90$,
— avec le glucagon : $\rho = 0,962$; $P_{(\rho)} = 0,004$; $b = 1,00$).

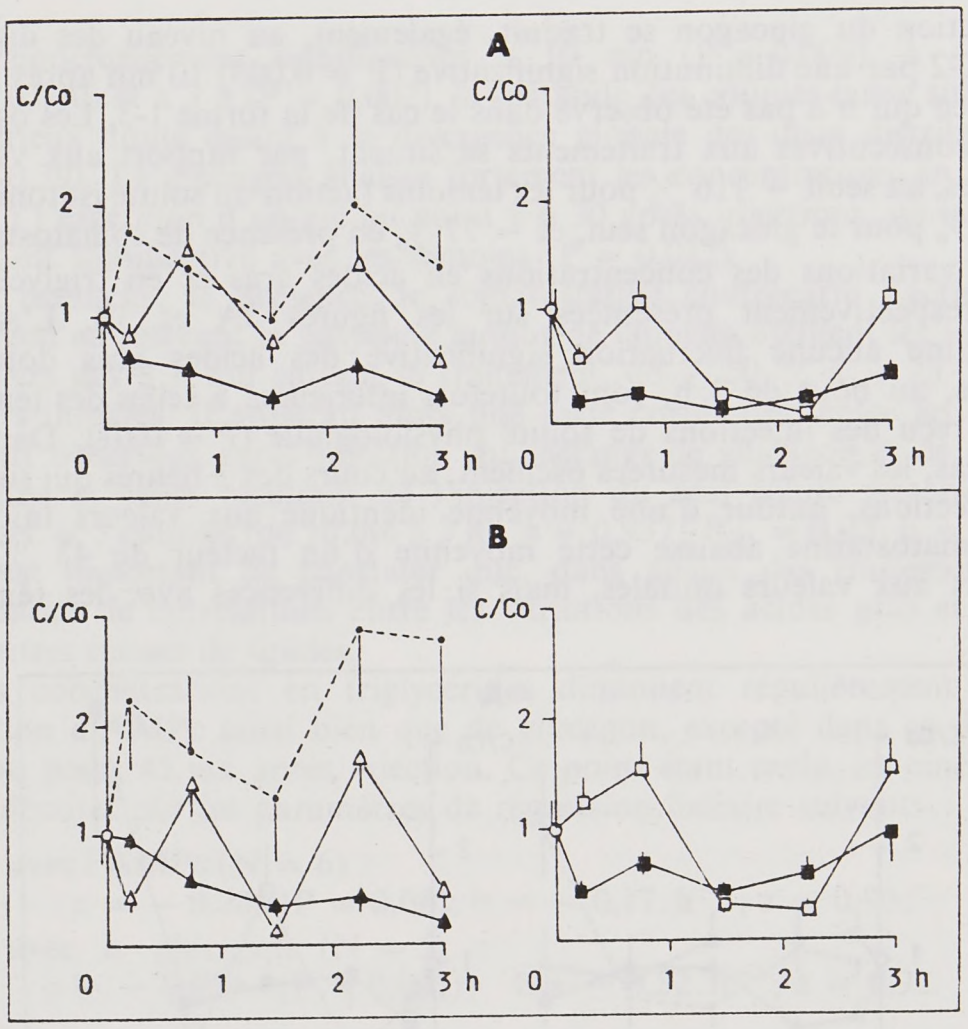


FIG. 2. — Variations des concentrations en diglycérides 1-2 (A) et 1-3 (B) de l'hémolymphe d'Abeille après injection d'AMPc (△) ou de glucagon (□) seuls ou en présence de somatostatine [respectivement : (▲) et (■)], et de soluté isotonique (- - - ● - - -). Les résultats sont exprimés en données relatives aux valeurs initiales (C/Co). Les écarts-types initiaux sont identiques aux coefficients de variation.

Il est a remarquer que l'AMPc entraîne, dans le cas des diglycérides comme avec les stéroïdes, mais contrairement aux phospholipides, une courte diminution des concentrations 10 mn après injection, relativement aux valeurs résultant de l'injection de soluté physiologique. Les différences sont très significatives aussi bien avec les diglycérides 1-2 ($P = 0{,}012$) qu'avec la forme 1-3 ($P = 0{,}001$). En revanche, à partir du prélèvement à 45 mn, le spectre des variations est comparable à celui observé après injection de soluté physiologique. Les concentrations oscillent autour d'une moyenne identique aux valeurs initiales, au cours des 3 heures qui suivent les injections, c'est-à-dire à un niveau inférieur de 50 % à celui des témoins. La présence de somatostatine abaisse encore les valeurs moyennes à un niveau inférieur, quant à lui, de 55 % aux valeurs initiales. Les mêmes observations sont effectuées en ce qui concerne les diglycérides 1-3.

L'action du glucagon se traduit, également, au niveau des diglycérides 1-2 par une diminution significative (P = 0,003) 10 mn après injections, ce qui n'a pas été observé dans le cas de la forme 1-3. Les oscillations consécutives aux traitements se situent, par rapport aux valeurs initiales, au seuil + 116 % pour les témoins (action du soluté isotonique), − 40 % pour le glucagon seul, et − 77 % en présence de somatostatine.

Les variations des concentrations en acides gras et en triglycérides sont respectivement présentées sur les figures 3A et 3B. L'AMPc n'entraîne aucune fluctuation significative des acides gras dont les teneurs, au bout de 3 h, sont toutefois inférieures à celles des témoins ayant reçu des injections de soluté physiologique (P = 0,01). Dans les deux cas, les valeurs mesurées oscillent, au cours des 3 heures qui suivent les injections, autour d'une moyenne identique aux valeurs initiales. La somatostatine abaisse cette moyenne d'un facteur de 43 % par rapport aux valeurs initiales, mais si les différences avec les témoins

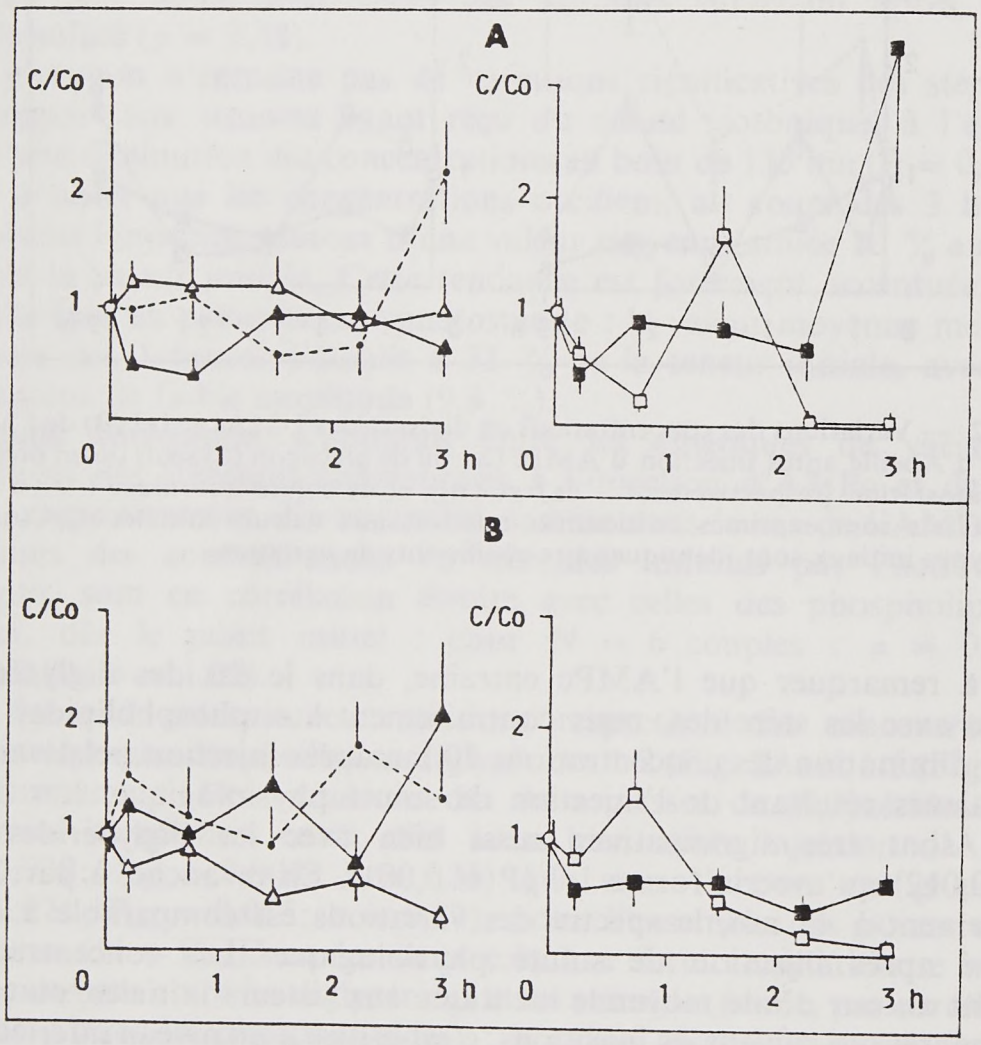


FIG. 3. — Variations des concentrations en acides gras (A) et en triglycérides (B) de l'hémolymphe d'Abeille après injection d'AMPc (△) ou de glucagon (□) seuls ou en présence de somatostatine [respectivement : (▲) et (■)], et de soluté isotonique (- - - ● - - -). Les résultats sont exprimés en données relatives aux valeurs initiales (C/Co). Les écarts-types initiaux sont identiques aux coefficients de variation.

sont ponctuellement significatives à 10 mn ($P = 0,009$), à 45 mn ($P = 0,010$) et à 3 h ($P = 0,002$), la méthode des couples laisse subsister un sérieux doute quant à la divergence globale des deux distributions ($P = 0,39$). Le glucagon abaisse fortement les concentrations en acides gras, à l'exception d'un pic au point 1 h 30 après injections, où la différence est significative avec les témoins ($P = 0,012$).

En revanche, la présence de somatostatine contrecarre l'action du glucagon en relevant la moyenne autour de laquelle oscillent les valeurs, au cours des 3 h qui suivent le traitement, de − 50 % à + 25 % des valeurs initiales. Il apparaît alors une forte corrélation entre les distributions observées après injection du mélange de glucagon et de somatostatine et celles résultant de l'injection du seul soluté isotonique : pour $N = 5$ couples (de 10 mn à 3 h), $\rho = 0,937$; $P_{(\rho)} = 0,02$; $b = 1,73$).

Il est important de constater que, dans aucun des traitements, il n'apparaît de corrélations entre les variations des acides gras et celles des autres classes de lipides.

Les concentrations en triglycérides diminuent régulièrement après injection d'AMPc aussi bien que de glucagon, excepté dans ce dernier cas, au point 45 mn après injection. Ce point étant exclu, les cinétiques sont décrites par les paramètres de régression linéaire suivants :

— avec l'AMPc ($N = 6$) :
$\rho = - 0,783$ ($P = 0,06$); $b = - 0,17.h^{-1}$; $a = 0,90$;
— avec le glucagon ($N = 5$) :
$\rho = - 0,989$ ($P = 0,001$); $b = - 0,32.h^{-1}$; $a = 0,92$.

Les valeurs moyennes globales des concentrations en triglycérides, mesurées de 10 mn à 3 heures après injection (exprimées en unités relatives C/Co), passent de 0,61 avec l'AMPc seul à 1,31 en présence de somatostatine, et 1,36 après injection de soluté physiologique. Comme dans le cas des acides gras, la somatostatine rapproche donc les résultats de ceux obtenus chez les témoins. Les valeurs ponctuelles respectives sont comparables, excepté dans les prélèvements effectués 2 h 15 après injections ($P = 0,06$).

L'examen de la figure 3B montre que les oscillations de concentrations en triglycérides consécutives à l'injection d'AMPc seul sont exactement en opposition de phase avec celles résultant de l'addition de somatostatine. Le calcul de corrélation donne, pour $N = 6$ couples : $\rho = - 0,800$ ($P = 0,05$); $b = 2,23$. Il en va différemment avec le glucagon, où l'addition de somatostatine ne change pas la moyenne autour de laquelle oscillent les valeurs mesurées, de 10 mn à 3 heures ($C/Co = 0,55$), mais atténue, en revanche, très significativement l'amplitude des variations : le tableau II résume les comparaisons de variances effectuées pour les diverses classes de lipides. Il apparaît ainsi nettement que la somatostatine est inapte à réduire l'amplitude des oscillations des acides gras (sauf en présence d'AMPc, par rapport au soluté isotonique seul) et celles des triglycérides dans les seuls cas où intervient l'AMPc, dont l'interaction se distingue ainsi de celle du glucagon.

TABLEAU II. — Action de la somatostatine sur l'amplitude des oscillations des concentrations lipidiques de l'hémolymphe d'Abeille après injections d'AMPc ou de glucagon (Gcgn) seuls ou additionnés de somatostatine (Sm), et de soluté isotonique (Sol.).

Traitements comparés	F	$P_{(F)}$	Traitements comparés	F	$P_{(F)}$
Phospholipides :			Diglycérides 1-2 :		
AMPc/AMPc+Sm	179,0	$0,9.10^{-3}$	AMPc/AMPc+Sm	5,82 b	0,058
Sol./AMPc+Sm	5,3 b	0,067	Sol./AMPc+Sm	4,68 b	0,082
Gcgn/Gcgn+Sm	24,2	0,004	Gcgn/Gcgn+Sm	17,60	0,008
Sol./Gcgn+Sm	4,9 b	0,076	Sol./Gcgn+Sm	13,02	0,014
Stéroïdes :			Diglycérides 1-3 :		
AMPc/AMPc+Sm	11,8	0,017	AMPc/AMPc+Sm	5,18 b	0,070
Sol./AMPc+Sm	4,30 b	0,093	Sol./AMPc+Sm	4,97 b	0,074
Gcgn/Gcgn+Sm	18,2	0,008	Gcgn/Gcgn+Sm	4,54 b	0,086
Sol./Gcgn+Sm	6,66	0,047	Sol./Gcgn+Sm	8,00	0,034
Acides gras :			Triglycérides :		
AMPc/AMPc+Sm	$4,74^{-1}$ a	0,093	AMPc/AMPc+Sm	$4,68^{-1}$ a	0,082
Sol./AMPc+Sm	6,17	0,052	Sol./AMPc+Sm	2,07 c	0,25
Gcgn/Gcgn+Sm	$2,83^{-1}$ c	0,17	Gcgn/Gcgn+Sm	31,56	0,003
Sol./Gcgn+Sm	3.42^{-1} c	0,13	Sol./Gcgn+Sm	11,90	0,017

(a) Inversion de l'ordre des amplitudes. (b) Écarts faiblement significatifs et (c) pas d'écarts significatifs entre les variances.

Les variances sont comparées au moyen du rapport $F = \sigma_1/\sigma_2$ dont la signification $P_{(F)}$ est calculée d'après l'équation de distribution de Fisher, aux degrés de liberté $\upsilon_1 = \upsilon_2 = 4$.

Enfin, une corrélation apparaît depuis le point initial jusqu'au prélèvement à 2 h 15, entre les variations des triglycérides et celles des diglycérides 1-2, des stéroïdes et des phospholipides, sous l'action du glucagon. Pour N = 5 couples, les paramètres de corrélation/régression sont les suivants :

avec les diglycérides 1-2 : $\rho = 0,958$ ($P = 0,01$); $b = 1,01$;
avec les stéroïdes : $\rho = 0,993$ ($P < 0,001$); $b = 1,04$;
avec les phospholipides : $\rho = 0,925$ ($P = 0,02$); $b = 1,18$.

Discussion et conclusions. — L'AMP cyclique présente un effet hyperlipémiant dans le seul cas des phospholipides. Il ne change pas le niveau moyen autour duquel oscillent les variations de concentrations en stéroïdes, diglycérides 1-2 et acides gras; il abaisse légèrement celui des diglycérides 1-3 et davantage celui des triglycérides. L'injection simultanée de somatostatine supprime généralement l'action de l'AMPc et l'effet du mélange se résume aux effets fortement hypolipémiants de la somatostatine injectée seule, dans le cas des phospholipides, des

stéroïdes et des diglycérides. Cet effet est moins marqué pour les acides gras et se traduit, dans le cas des triglycérides, par l'annulation réciproque par l'AMPc et la somatostatine de leurs effets respectifs, la somme des deux conduisant alors aux mêmes résultats que l'injection de soluté isotonique.

Le glucagon ne modifie guère le niveau moyen des phospholipides ni celui des diglycérides 1-3; il abaisse légèrement celui des stéroïdes et davantage celui des autres classes de lipides. La somatostatine injectée simultanément domine l'action du glucagon par ses effets hypolipémiants dans le cas des phospholipides, des stéroïdes, des diglycérides et même des triglycérides. En revanche, dans le cas des acides gras, le glucagon et la somatostatine annihilent réciproquement leurs activités respectives hypolipémiantes, de sorte qu'il en résulte un effet comparable à celui de l'injection de soluté physiologique. C'est la même interaction que celle qui se produit entre l'AMPc et la somatostatine vis-à-vis des triglycérides. Il est intéressant de constater que, chez l'Homme, le glucagon provoque, comme chez l'Abeille, une brève augmentation suivie d'une chute des concentrations en acides gras (12).

Dans trois cas seulement, une certaine ressemblance se manifeste à court terme (de 10 à 90 mn), sur les mêmes classes de lipides, entre les effets respectifs de l'AMPc et ceux du glucagon. Les coefficients de corrélation et les pentes de régression correspondants sont successivement :

— pour les stéroïdes : $\rho = 0{,}776$ ($P = 0{,}22$); $b = 0{,}74$ ($N = 4$)
— pour les diglycérides 1-2 : $\rho = 0{,}799$ ($P = 0{,}20$); $b = 0{,}84$ ($N = 4$)
— pour les triglycérides : $\rho = 0{,}792$ ($P = 0{,}11$); $b = 1{,}26$ ($N = 5$) pt 45 mn exclus.

Aucune autre corrélation n'a pu être mise en évidence.

En revanche, l'action de l'AMPc se traduit, entre les temps 45 mn et 3 heures, par des fluctuations de même phase que celles consécutives à l'injection de soluté isotonique, toujours dans le cas des stéroïdes et des diglycérides. Des corrélations très faiblement significatives ont été observées dans les deux cas suivants ($N = 4$ couples) :

— stéroïdes : $\rho = 0{,}580$ ($P = 0{,}4$); $b = 0{,}90$;
— diglycérides 1-2 : $\rho = 0{,}581$ ($P = 0{,}4$); $b = 0{,}66$.

Cette observation peut suggérer que les décharges d'hormones endogènes consécutives au choc de l'injection de soluté isotonique agissent, au moins en partie, par intermédiaire d'une libération d'AMPc.

Il apparaît donc que les analogies d'action entre l'AMPc et le glucagon précédemment constatées au niveau de la mobilisation du tréhalose et du glucose dans l'hémolymphe ne se retrouvent, en apparence, que de manière fragmentaire au niveau des lipides.

La somatostatine, injectée en même temps que l'AMPc et le glucagon, tend à leur substituer sa propre action hypoglycémiante accompagnée d'une neutralisation des oscillations de concentrations qui suivent

habituellement tout choc physiologique. Toutefois, il est à remarquer que les acides gras échappent à ce phénomène avec l'AMPc comme avec le glucagon, tandis que, dans le cas des diglycérides 1-2, les effets du glucagon sont les plus significativement effacés par ceux de la somatostatine. Il semblerait donc que, dans ce dernier cas, le « second messager » soit moins fortement assujetti au contrôle par la somatostatine que le « premier ».

Très peu de travaux ont été publiés, jusqu'ici, dans ce domaine de recherche, chez les Insectes, et il n'est guère possible de comparer les résultats qu'avec ceux obtenus chez les Vertébrés.

Il est intéressant de souligner que, pour les triglycérides, l'addition de somatostatine à l'AMPc injecté n'atténue pas l'amplitude des oscillations, mais provoque des variations de sens opposé à celles dues à l'AMPc seul : une telle forme d'antagonisme est à rapprocher de celle observée chez le Chien, entre le glucagon et la somatostatine, au niveau des stéroïdes (13).

L'hypothèse de l'activation de l'AMP cyclase par la fixation du glucagon sur son récepteur, selon Biedzinski, 1978 (11), ne paraît ici évidente, compte tenu des analogies constatées, que dans le cas de leurs effets à court terme sur les stéroïdes et les diglycérides 1-2. A plus long terme, l'AMP cyclase serait activée par des hormones endogènes différentes du glucagon de Vertébrés libérées sous l'action de l'injection de soluté physiologique. La stéroïdémie ainsi que la sécrétion biliaire du cholestérol sont réduites chez l'Homme (12) et chez le Chien (13), respectivement, sous l'action du glucagon : la même tendance est observée dans l'hémolymphe d'Abeille, malgré deux pics de retour à la normale à 45 mn et 180 mn. D'autre part, la diminution des concentrations en triglycérides observée chez l'Abeille sous l'action du glucagon présente un intérêt particulier en ce qu'elle concorde, de son côté, avec des observations effectuées par Andel et coll. (12) chez l'Homme recevant par perfusion de 0,1 à 0,8 mg de glucagon dans 100 ml de sérum. Le même résultat est obtenu chez l'Abeille sous l'action de l'AMPc, ce qui concorde également avec les travaux de Biedzinski (11) montrant que la libération d'AMPc consécutive à la formation d'un complexe glucagon/récepteurs, entraîne une activation des triglycérides-lipases. Ces observations expliquent également la libération de glycérol libre sous l'action conjuguée du glucagon et de l'AMPc (7), mais elles diffèrent donc de ce qui avait été précédemment rapporté quant à l'action de l'hormone lipotrope chez le Criquet (5).

Connaissant, d'une part, les similitudes que présente l'action de l'adrénaline avec celle de l'AMP cyclique, sur le métabolisme des triglycérides (6, 7), et compte tenu, d'autre part, du fait que l'adrénaline pourrait agir sans avoir recours à l'intermédiaire de l'AMPc (3), il nous a paru intéressant de poursuivre le travail en cours en examinant l'action d'adrénergiques sur la lipémie de l'Abeille, ainsi que les modes d'interaction respectifs de la somatostatine et d'anti-adrénergiques.

La comparaison des résultats avec les données qui viennent d'être présentées devrait permettre d'apporter quelques éléments nouveaux à la connaissance des mécanismes de régulation de la lipémie de l'Abeille.

Bibliographie

1. Castillon M. P., Catalan R. E. & Municio A. M., *FEBS Letters*, 1973, *32*, 113-115.
2. Bounias M., *C. R. Acad. Sc.*, 1985, sous presse.
3. Exton J. H., Cherrington A. D., Hutson N. J. & Assimacopoulos-Jeannet F., *in:* Glucagon: Its Role Physiol. Clin. Med. (Satell. symp., 1976), 1977, 321-347.
4. Volpe J. J. & Marasa J. C., *in:* Glucagon: Its Role Physiol. Clin. Med. (Satell. symp., 1976), 1977, 495-516.
5. Spencer I. M. & Candy D. J., *Insect Biochem.*, 1976, *6*, 289-296.
6. Hadivanova N. & Georgiev G., *in:* Phys. Chem. Bases Biol. Inf. Transfer (Proc. 1st int. Colloq., 1974), 1975, 419-426.
7. Dax E., Partilla J. S. & Gregerman R. I., *J. Lipid Res.*, 1981, *22*, 934-943.
8. Pry T. A. & Porter J. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, *100*, 1002-1009.
9. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, *179*, 591-599.
10. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1983, *177*, 14-21.
11. Biedzinski T. M., *Przegl. Lek.*, 1978, *35*, 729-733.
12. Andel M., Brodan V. & Kuhn E., *Cas Lek Cesk.*, 1976, *115*, 764-766.
13. Bickerstaff K. I., Garberoglio C., Baker A. & Moossa A. R., *Surg. Forum*, 1982, *33*, 204-206.

C. R. Soc. Biol., 1986, *180*, 89-97.

Biochimie comparée.

Interactions agonistes et antagonistes de quelques effecteurs peptidergiques et aminergiques sur la lipémie de l'Abeille *in vivo*

par MICHEL BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, BP 91, F 84140 Montfavet

(reçue le 22 janvier 1986).

Summary. — The variations of the concentrations of the major lipid classes of emerging workerbees haemolymph were determined following *in vivo* injections of one peptidic hormone (glucagon) in presence of an aminergic antagonist (propranolol) and of an aminergic hormone (noradrenaline) in presence of a peptidergic antagonist (somatostatin), as an examination for the analogies and differences of the action of the two regulatory systems. The results were compared to those obtained with the effectors alone, and also to those of cyclic AMP injections.

The only mechanism consistent with a common lipolytic action of noradrenaline, glucagon and cAMP was observed on triacylglycerols. This mechanism was reversed by the β antagonist propranolol only in the case of noradrenaline. Glucagon was globally not susceptible to propranolol, whereas noradrenaline and somatostatin reciprocally neutralized their respective activities: the resulting effects were characteristic of none of the two effectors, excepted a stimulation of the noradrenergic increase of fatty acids. The different lipid classes might be independently regulated by the aminergic and the peptidergic systems binding to different types of receptors.

Résumé. — Les variations de concentrations en lipides des principales classes, dans l'hémolymphe d'abeilles ouvrières naissantes, ont été analysées après injection *in vivo* d'une hormone peptidique (le glucagon), en présence d'un antagoniste aminergique (le propranolol) et d'une hormone aminergique (la noradrénaline), en présence d'un antagoniste peptidergique (la somatostatine), afin d'examiner les analogies et les divergences d'action des deux systèmes régulateurs. Les résultats ont été comparés à ceux des effecteurs isolés, ainsi qu'à ceux précédemment obtenus avec l'AMP cyclique.

Le seul mécanisme compatible avec une action lipolytique commune à la noradrénaline, au glucagon et à l'AMPc concerne les triglycérides. Ce mécanisme est inversé par le propranolol (β-antagoniste) dans le seul cas de l'action de la noradrénaline. Le glucagon est globalement insensible à l'action du propranolol, tandis que la noradrénaline et la somatostatine neutralisent réciproquement leurs activités respectives, pour

ne laisser place à aucun effet caractéristique de l'une d'entre elles, à l'exception d'une potentialisation de la libération noradrénergique des acides gras. Les diverses classes de lipides pourraient être régulées de manière indépendante par les systèmes aminergiques et peptidergiques agissant sur des récepteurs distincts.

La noradrénaline et le glucagon sont deux effecteurs potentiels de régulation du métabolisme de l'Abeille : en effet, la présence de noradrénaline, déjà signalée à plusieurs reprises dans le venin (1) a été également confirmée récemment dans la tête, le thorax et l'abdomen de l'animal (2), tandis que ses propriétés hyperglycémiantes ont été mises en évidence depuis plusieurs années (3).

D'autre part, la présence de glucagon a été signalée dans le cerveau de l'Abeille (4), et l'existence de récepteurs hyperglycémiants sensibles à son activité a été démontrée par injections *in vivo* de l'hormone extraite de Mammifères (5). Dans une précédente communication, nous avons montré que le glucagon agit également sur la lipémie, en particulier en diminuant les concentrations des triglycérides et, au moins partiellement, celles des diglycérides 1-2 et des acides gras (6).

Certaines analogies ayant été mises en relief, entre l'activité du glucagon et celle de l'AMP cyclique (comme « second messager » possible) sur la glycémie (7) mais également, quoique de manière moins prononcée, sur la lipémie de l'Abeille (5), il paraissait intéressant de comparer également les modes d'action respectifs, sur la lipémie, des deux effecteurs « primaires » ayant déjà en commun une activité hyperglycémiante : le glucagon et la noradrénaline. Le premier présentant une structure peptidique et le second étant une amine de faible masse molaire, il n'est guère aisé, *a priori*, de formuler des hypothèses quant à l'existence possible de récepteurs communs à ces deux types de molécules. L'une des voies d'approche, en attendant que l'isolement de ces récepteurs puisse être réalisé, consiste à analyser comparativement sur l'activité de chacune des deux hormones, l'incidence réciproque d'un inhibiteur peptidique : la somatostatine, et d'un antagoniste des récepteurs β-adrénergiques : le propranolol (8) : nous avons déjà pu, en effet, mettre en évidence, chez l'Abeille, la puissante activité hypolipémiante du premier (9) et le rôle anti-hyperglycémique du second (10).

Au cours d'expériences précédentes (6), il a été possible de montrer que, lorsque la somatostatine est injectée en même temps que le glucagon, les concentrations de l'hémolymphe en phospholipides, stéroïdes, diglycérides et triglycérides sont stabilisées à un niveau très bas : l'effet est, en cela, comparable à celui obtenu avec la somatostatine pure qui neutralise donc les oscillations de concentrations provoquées par le glucagon. En revanche, au niveau des acides gras, le glucagon et la somatostatine se neutralisent mutuellement et les variations sont comparables à celles consécutives à l'injection de soluté isotonique. Il nous a donc paru intéressant d'examiner si l'action du propranolol, vis-à-vis du glucagon, est comparable, ou non, à celle de la somatostatine, c'est-à-dire si l'anti-adrénergique interagit avec l'effecteur peptidergique.

Réciproquement, nous avons injecté à des lots l'abeilles une préparation contenant un mélange de noradrénaline et de somatostatine, afin d'examiner de quelle manière l'effecteur adrénergique interagit avec l'inhibiteur peptidergique.

Animaux et techniques. — Les abeilles ouvrières naissantes (*Apis mellifera, mellifera* L.) ont été prélevées et traitées dans les mêmes conditions que précédemment (6). Au cours de l'ensemble des expériences décrites, il a été utilisé 460 abeilles d'un poids moyen individuel de 121,2 ± 3,7 mg. Compte tenu des résultats antérieurs, les hormones ont été administrées aux concentrations suivantes, exprimées par individu : glucagon de Vertébrés : 0,1 nmole; dl-propranolol : 1,5 nmole; noradrénaline : 1 nmole; somatostatine cyclique de Vertébrés : 0,1 nmole. Leur injection a été effectuée après dissolution dans le soluté isotonique déjà décrit (6). Les prélèvements d'hémolymphe ont été effectués 10 mn après injection, puis à intervalles de 45 mn pendant 3 heures. L'extraction et l'analyse des lipides ont été effectuées dans les mêmes conditions que précédemment (6). Des lots de 9 abeilles ont été utilisés pour chaque traitement et chaque durée après injection. Les moyennes et les variances ont été calculées à partir de 3 mesures. Les probabilités de signification associées aux épreuves de comparaison de moyennes et aux coefficients de corrélation ont été calculées à partir de l'équation de distribution de « t » de Student.

Résultats. — Les concentrations moyennes des lipides appartenant aux principales classes représentées dans l'hémolymphe des abeilles, au cours des expériences décrites, sont précisées dans le tableau I. Par la suite, pour des raisons d'homogénéité, les résultats numériques seront exprimés en données relatives aux valeurs initiales soit C/Co.

TABLEAU I. — Valeurs moyennes des concentrations initiales en lipides des diverses classes, exprimées en mM, pour l'ensemble des expérimentations décrites.

Composants	Moyennes	Composants	Moyennes
Phospholipides	2,40 ± 0,20	Diglycérides 1-2	0,05 ± 0,006
Stéroïdes	0,10 ± 0,015	Diglycérides 1-3	0,03 ± 0,01
Acides gras	0,05 ± 0,01	Triglycérides	0,04 ± 0,006

La figure 1 présente une série de données préliminaires montrant les tendances moyennes de variations des principales classes de lipides, au cours des 3 heures qui suivent l'injection de noradrénaline, de propranolol ou du mélange des deux. Les résultats relatifs au glucagon, dont les cinétiques ont été décrites dans une précédente communication (6), y sont également présentés comparativement à ceux obtenus avec le mélange de glucagon et de propranolol.

La noradrénaline et le glucagon présentent ainsi une activité globalement hypolipémiante vis-à-vis des stéroïdes, des diglycérides et des triglycérides. En revanche, le propranolol est hyperlipémiant au niveau des phospholipides, des stéroïdes et des diglycérides 1-2, et non significativement actif par lui-même dans les autres cas. En mélange, les deux effecteurs produisent des effets de même sens que ceux de la noradrénaline pure, excepté dans le cas des triglycérides où le propranolol et la noradrénaline se neutralisent mutuellement pour laisser subsister une action similaire à celle provoquée par le soluté isotonique.

Le glucagon présente, comme l'a montré un précédent travail (6), une tendance hypolipémiante (sauf pour les phospholipides) : cette action est globalement atténuée par le propranolol dans le cas des stéroïdes et celui des diglycérides.

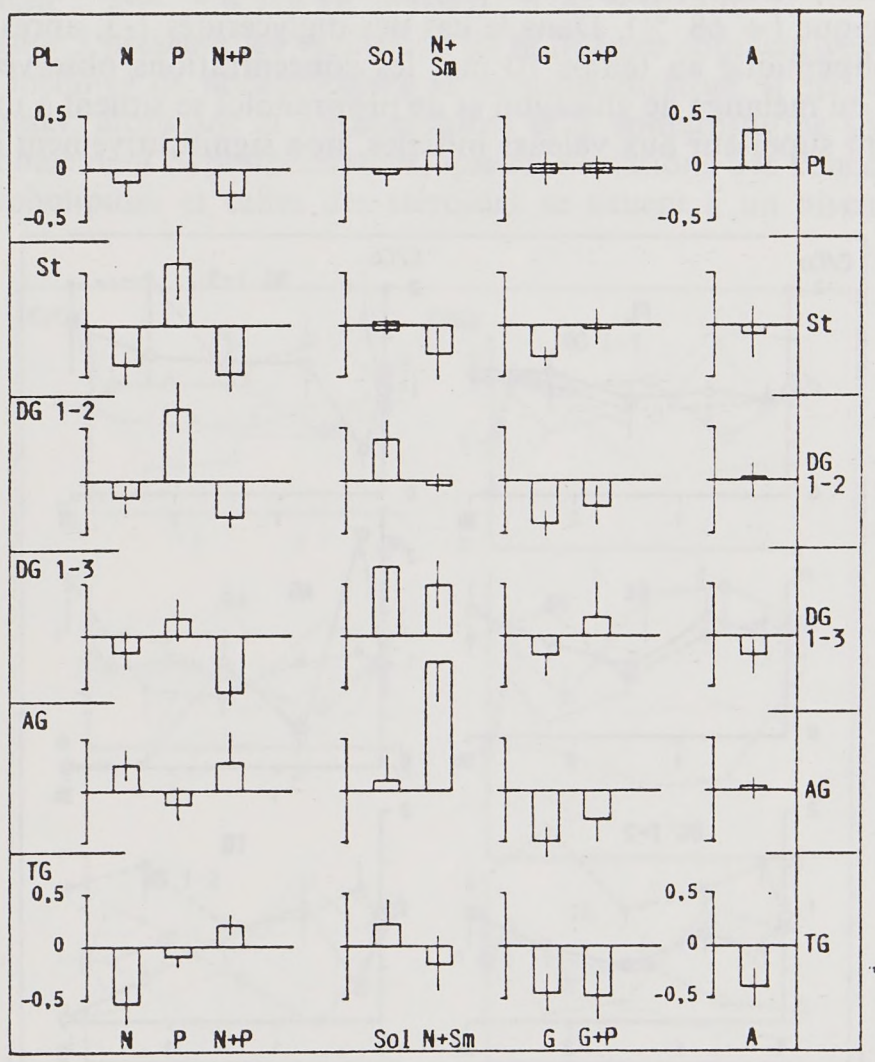


FIG. 1. — Variations moyennes relatives (C/Co-1) des concentrations globales (C) des diverses classes de lipides de l'hémolymphe d'Abeille, par rapport aux valeurs initiales Co, au cours d'une période de 10 mn à 3 h après injection des effecteurs suivants : N = noradrénaline (1 nmole); P = propranolol (1,5 nmole); G = glucagon (0,1 nmole); Sm = somatostatine (0,2 nmole); A = AMP cyclique (0,5 nmole); Sol = soluté isotonique. Les moyennes et les écarts-types proviennent de 5 mesures.

La figure 2 présente les résultats complets obtenus à la suite de l'injection simultanée du glucagon et du propranolol. Les variations constatées précédemment (6) avec le glucagon seul sont modifiées par la présence du propranolol dans plusieurs cas : les variations des concentrations en phospholipides et en stéroïdes se réduisent à celles observées consécutivement à l'injection de soluté physiologique : dans le premier cas (PL), l'analogie est mise en évidence par une corrélation : $\rho = 0{,}83$ ($P = 0{,}08$); $b = 0{,}85$ ($N = 5$ couples) et, dans le second cas (St), l'analyse de variance par la méthode des couples fait ressortir l'absence de différence entre les deux distributions ($P = 0{,}88$). Dans le cas des diglycérides 1-2, l'hypolipémie associée à l'injection de glucagon ($-$ 40 %) est partiellement rétablie en présence de propranolol ($-$ 23 %), ce qui paraît en accord avec l'influence hyperlipémiante du propranolol seul (données complètes encore non publiées, illustrées globalement sur la figure 1). Le niveau moyen reste, toutefois, inférieur à celui atteint après injection de soluté physiologique (+ 68 %). Dans le cas des diglycérides 1-3, après un bref pic hypolipémique au temps 10 mn, les concentrations observées après injection du mélange de glucagon et de propranolol se situent à un niveau légèrement supérieur aux valeurs initiales, non significativement différent

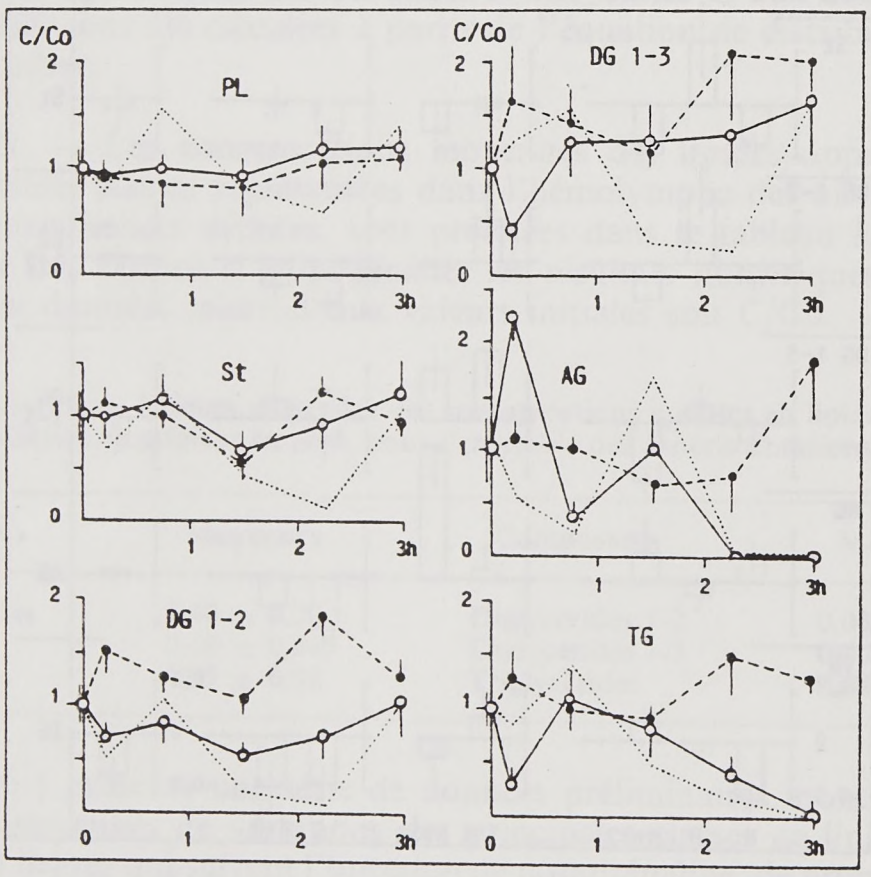


FIG. 2. — Cinétiques de variations de la lipémie de l'Abeille après injection simultanée de glucagon (0,1 nmole) et de propranolol (2 nmoles) (— o —) par comparaison avec les résultats de l'injection de glucagon seul (. . . .) et de soluté physiologique seul (-- ● --). PL = phospholipides; St = stéroïdes; AG = acides gras; DG = diglycérides ; TG = triglycérides.

de celui observé après injection de soluté physiologique. Les valeurs sont significativement supérieures à celles résultant de l'injection de glucagon, aux temps 90 mn ($P = 0,014$) et 135 mn ($P = 0,006$).

En ce qui concerne les acides gras, l'action du mélange de glucagon et de propranolol se superpose pratiquement à celle du glucagon seul, excepté au point 10 mn où le mélange provoque une augmentation de forte amplitude (+ 126 %) mais de courte durée. Ce point étant exclu, les deux cinétiques présentent une forte corrélation : pour $N = 5$ couples, $\rho = 0,930$ ($P_{(\rho)} = 0,02$); $b = 0,63$. Enfin, les concentrations des triglycérides diminuent en fonction du temps, comme cela avait été observé avec le glucagon seul ou l'AMPc (6) : la cinétique est décrite par la corrélation avec le facteur temps, soit $\rho = -0,64$ ($P = 0,17$); $b = -0,23\ h^{-1}$ pour $N = 6$ couples, ou de manière plus significative, le point $T = 10$ mn étant exclu : $\rho = -0,914$ ($P = 0,03$); $b = -0,35\ h^{-1}$.

La figure 3 présente les variations de la lipémie consécutives à l'injection du mélange de noradrénaline et de somatostatine. Il est intéressant de constater, alors que la noradrénaline et la somatostatine sont toutes deux globalement hypolipémiantes, que les variations des concentrations en phospholipides et celles des stéroïdes se situent à un niveau moyen

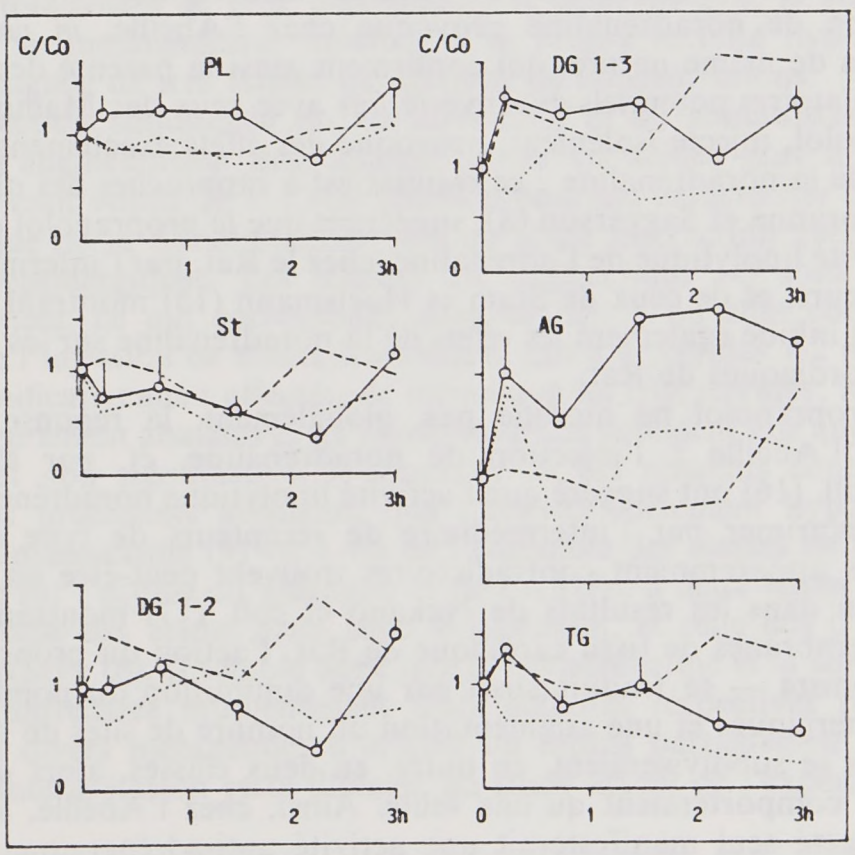


FIG. 3. — Cinétiques de variations de la lipémie de l'Abeille après injection simultanée de noradrénaline (1 nmole) et de somatostatine (0,2 nmole) (— o —) par comparaison avec les résultats de l'injection de noradrénaline seule (. . . .) et de soluté physiologique seul (---). PL = phospholipides; St = stéroïdes; AG = acides gras; DG = diglycérides; TG = triglycérides.

peu différent des valeurs initiales (respectivement + 16 % et − 27 %, non significatifs). De même, les diglycérides 1-2 oscillent autour d'une valeur identique à la valeur initiale, avec une oscillation d'assez large amplitude à 135 mn et 180 mn. En revanche, les diglycérides 1-3 et les acides gras augmentent respectivement de + 50 % et + 121 %, inversant chez les premiers et accentuant chez les seconds, les tendances globales de la noradrénaline pure.

Enfin, les triglycérides présentent une cinétique décroissante, caractérisée par le calcul de corrélation et régression linéaire : pour N = 6 couples, $\rho = -0{,}811$ (P = 0,05); $b = -0{,}21\ h^{-1}$ ce qui est à rapprocher des résultats de même nature précédemment obtenus avec l'AMPc et le glucagon (6).

Discussion et conclusions. — Les effets lipolytiques d'origine adrénergique ou noradrénergique observés chez les Vertébrés, y compris l'Homme, se traduisent, selon certains auteurs, par l'hydrolyse des phospholipides (11) et des triglycérides (12), ainsi qu'une augmentation des concentrations en acides gras libres (13). Des observations de même nature avaient été rapportées dès 1968, chez un Insecte, par Bhakthan et Gilbert (14) : l'action de l'adrénaline sur des extraits de corps adipeux de Diptères *in vitro* se traduit par une diminution de la libération des diglycérides et une augmentation de celle des acides gras.

L'injection de noradrénaline provoque chez l'Abeille, *in vivo*, des phénomènes de même nature, qui confirment ainsi la parenté des mécanismes régulatoires potentiels des Invertébrés avec ceux des Mammifères. Le propranolol, injecté isolément, provoque des effets exactement opposés à ceux de la noradrénaline : ce résultat est à rapprocher des observations de Sooranna et Saggerson (8), suggérant que le propranolol contrecarre l'activité lipolytique de l'adrénaline, chez le Rat, par l'intermédiaire de β-récepteurs, et de ceux de Stam et Huelsmann (15) montrant que le propranolol inhibe également les effets de la noradrénaline sur les lipides des tissus cardiaques de Rat.

Or, le propranolol ne modifie pas, globalement, la réponse de la lipémie de l'Abeille à l'injection de noradrénaline, et, par ailleurs, Martin et coll. (16) ont suggéré que l'activité lipolytique noradrénergique pourrait s'exprimer par l'intermédiaire de récepteurs de type α. Ces observations apparemment contradictoires trouvent peut-être un début d'explication dans les résultats de Nakano et coll. (17) montrant que, dans des membranes de tissu cardiaque de Rat, l'action du propranolol — β-antagoniste — se traduit aussi par une diminution du nombre de sites α adrénergiques et une augmentation du nombre de sites de type β. Ces derniers se subdiviseraient, en outre, en deux classes, alors que les sites α n'en comporteraient qu'une seule. Ainsi, chez l'Abeille, le propranolol injecté seul manifesterait une activité anti-adrénergique généralisée, tandis qu'en présence de noradrénaline, le démasquage d'un nombre accru de récepteurs *β* provoquerait la réponse inverse.

Le cas des triglycérides est particulièrement intéressant en ce qu'il est

le seul à faire apparaître une action anti-noradrénegique du propranolol, en même temps qu'une homologie d'action de la noradrénaline, du glucagon et de l'AMP cyclique lui-même. Sur ce point précis, et celui-là seulement, il est permis de formuler l'hypothèse d'un contrôle β-adrénergique exercé par la noradrénaline, par l'intermédiaire de l'AMPc comme second médiateur, tandis que le glucagon agirait dans le même sens, mais par l'intermédiaire de récepteurs de type différent. La somatostatine tendrait seulement à atténuer l'importance quantitative du phénomène.

La libération d'acides gras sous l'action de la noradrénaline chez l'Homme (13) pourrait se dérouler également par l'intermédiaire de l'AMPc dont Shickley et Krieger (18) ont mis en évidence l'augmentation après injection de noradrénaline dans les tissus cérébraux du Rat. Tel ne paraît pas être le cas chez l'Abeille, où l'injection d'AMPc reste sans effets sur les acides gras, tandis que le glucagon en diminue les concentrations.

De façon générale, le propranolol ne présente, dans nos conditions expérimentales, aucun effet antagoniste vis-à-vis du glucagon. Des variations de sens opposé n'ont été observées que dans le cas des diglycérides 1-3, mais les résultats ne sont pas statistiquement significatifs.

L'interaction de la somatostatine avec l'activité de la noradrénaline diffère totalement de celle précédemment observée avec le glucagon (6), auquel la somatostatine substituait sa propre activité hypolipémiante accompagnée de très faibles oscillations de concentrations.

L'injection simultanée de noradrénaline et de somatostatine potentialise l'augmentation des concentrations en acides gras d'un facteur multiplicatif voisin de 5. Cette réaction pourrait caractériser une activité spécifique de la noradrénaline hors de toute interaction avec les récepteurs peptidergiques. Les teneurs en diglycérides 1-3 sont également augmentées, ce qui correspond, dans ce cas, à un effet comparable à celui de l'injection de soluté isotonique. Les diglycérides 1-2 ne semblent pas significativement affectés, de même que les triglycérides; les stéroïdes sont légèrement abaissés et les phospholipides subissent une augmentation faible et non significative. L'ensemble de ces résultats contraste donc avec les précédents montrant que l'activité fortement hypolipémiante de la somatostatine (9) vis-à-vis de l'ensemble des classes de lipides prédomine sur l'action du glucagon et de l'AMPc, à deux seules exceptions près : celle des acides gras, avec le glucagon, et celle des triglycérides, avec l'AMPc (6). Il semble donc que la noradrénaline et la somatostatine aient contrecarré mutuellement leurs activités respectives pour laisser place à divers mécanismes d'origine au moins partiellement endogène, dont l'interprétation reste difficile, au stade actuel de l'expérimentation.

En conclusion, seuls les triglycérides semblent être placés sous le contrôle d'un double système hormonal peptidergique et aminergique compatible avec un rôle médiateur de l'AMP cyclique comme dans le cas des glucides (7). Des β-récepteurs sensibles au propranolol pour-

raient alors être impliqués dans le cas de la noradrénaline, mais vraisemblablement pas dans celui du glucagon. Pour les autres classes de lipides, l'action de la noradrénaline n'est pas combattue par le propranolol et il serait intéressant d'examiner l'activité, à ce niveau, d'un antagoniste des α-récepteurs, tel que la phentolamine. Enfin, la somatostatine agit, vis-à-vis de la noradrénaline, de manière totalement différente de celle qui a été précédemment observée avec le glucagon et l'AMPc : les systèmes peptidergiques et aminergiques accusent donc, à ce niveau, une divergence très marquée.

Bibliographie

1. Owen M. D. & Bridges A. R., *Toxicon*, 1982, *20*, 1075-1084.
2. Lecomte J., Bourdon V. & Magis S., *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 1984, *53*, 317-322.
3. Bounias M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* (Liège), 1980, *88*, 93-98.
4. Maier V., Grubbe D., Steiner R., Greischel A. & Pfeiffer D., The New Frontier: Abst. Int. Symp. Brain-Gut Axis, Florence, p. 119.
5. Bounias M. & Pachéco H., *C. R. Acad. Sc.*, 1979, *289 D*, 201-204.
6. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1986, *180*, 77-88.
7. Bounias M., *C. R. Acad. Sci.*, 1986, *302*, 141-144.
8. Sooranna S. R. & Saggerson E. D., *FEBS Lett.*, 1978, *90*, 141-144.
9. Bounias M. *C. R. Soc. Biol.*, 1985, *179*, 591-599.
10. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, *179*, 218-223.
11. Schoepp D. D., Knepper S. M. & Rultedge C. O., *J. Neurochem.*, 1984, *43*, 1758-1961.
12. Hadivanova N. & Georgiev G., *in:* Phys. Chem. Bases Bio. Inf. Transfer (Proc. 1st Int. Colloq.), 1974 (Pub. 1975), 419-426.
13. Moericke R., Schuster E. & Caruso M., *Z. Gesamte Inn. Med. Ihre Grenzgeb.*, 1981, *36*, 433-443.
14. Bhakthan N. M. G. & Gilbert L. E., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1968, *11*, 186-197.
15. Stam H. & Huelsmann W. C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, *794*, 72-82.
16. Martin C., Martin A. & Varnet B., *Ann. Anesth. Franç.*, 1983, *1*, 85-96.
17. Nakano R., Li S. & Imura H., *Naika Hokan*, 1983, *30*, 293-300.
18. Shickley T. & Krieger N. L., *Life Sci.*, 1984, *35*, 2421-2426.

No. 12 Volume 18 December 1986 Page 795–874

Hormone and Metabolic Research

Horm. metabol. Res. 18 (1986) 804–810
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Editors-in-Chief:
E. F. Pfeiffer, Ulm
G. M. Reaven, Palo Alto

Assistant Editors:
W. D. Hetzel, Ulm
A. R. Hoffman, Palo Alto

Co-Editors:
E. E. Baulieu, Paris
G. Bettendorf, Hamburg
K. J. Catt, Bethesda
S. S. Fajans, Ann Arbor
V. G. Foglia, Buenos Aires
E. A. Friedman, New York
W. Gepts, Brussels
J. J. Hoet, Brussels
S. H. Ingbar, Boston
Ch. Lauritzen, Ulm
R. Levine, Duarte
R. J. Mahler, Rancho Mirage
W. J. Malaisse, Brussels
T. J. Martin, Melbourne
L. Martini, Milan
P. Mialhe, Strasbourg
S. Raptis, Athens
W. Reutter, Berlin
E. Tonutti, Ulm
R. Yalow, New York
R. Ziegler, Heidelberg

Noradrenaline, Propranolol and Adrenochrome Interactions with the Dynamic of Haemolymph Lipids in Worker Honeybees

M. Bounias

Laboratoire de Biochimie, INRA, Avignon, France

Summary

Injection of worker honeybees with noradrenaline, *in vivo*, depresses the haemolymph levels of phospholipid, steroid and triacylglycerols. The major fatty acids fraction shows large amplitude variations which seem to be dependent on several distinct factors. Adrenochrome exhibits a tendency to induce global hypoglycemic effects without evident correlation with the other hormones, whereas propranolol counteracts the effects of noradrenaline, particularly for phospholipids, steroids and diacylglycerols. The results suggest that the major lipoprotein complex is partly under the control of low specificity adrenoceptors.

Key-Words: *Noradrenaline – Propranolol – Adrenochrome – Haemolymph – Lipids – Phospholipids – Steroids – Fatty Acids – Mono-Di-Triacyl Glycerols*

Reprint
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
Reprint with the permission of the publishers only

C. R. Soc. Biol., 1986, *180*, 512-519.

Biochimie.

Étude cinétique de la glycémie de l'Abeille après injection de dl-octopamine *in vivo*

par MICHEL BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, F 84140 Montfavet, France

(reçue le 30 septembre 1986).

Summary. — Injecting dl-octopamine to emerging worker honeybees *in vivo* (0.1 and 1 nmol per bee) raises the trehalosemia (+ 20 %) after 2 hrs with dose 1 nmol, whereas a considerably higher glucose peaking (+ 94 % to + 123 %) respectively occurs after 2 hrs and 1.5 hr with 0.1 and 1 nmol. A strong negative correlation is observed between trehalose and glucose from 10 min to 90 min following injections, which is consistent with the hypothesis of an activation of the haemolymph trehalases by octopamine.

The hyperglycemic response of octopamine is much weaker and delayed than the adrenaline one. By contrast, it shows some similarities with the action of dopa and dopamine, and also with the second hyperglycemic peak elicited by both glucagon and cAMP.

Résumé. — L'injection de dl-octopamine à des abeilles ouvrières naissantes, *in vivo*, à raison de 0,1 à 1 nmole par individu, entraîne un pic hypertréhalosémique (+ 20 %) au bout de 2 heures avec la dose 1 nmole, tandis qu'une hyperglucosémie, d'une amplitude considérablement plus forte (+ 94 % à + 123 %) est observée respectivement après 2 heures et 1 h 30 avec les doses 0,1 et 1 nmole. Une forte corrélation négative, observée entre le tréhalose et le glucose de 10 mn à 90 mn après injection, paraît compatible avec l'hypothèse d'une activation des tréhalases par l'octopamine.

La réponse hyperglycémique à l'octopamine est beaucoup plus faible et plus tardive que celle à l'adrénaline. Elle présente, en revanche, certaines analogies avec les réponses à la dopa et à la dopamine, ainsi qu'avec le second pic hyperglycémique commun au glucagon et à l'AMP cyclique.

Le premier facteur aminergique décelé chez l'Abeille a été, semble-t-il, la noradrénaline découverte dans le venin en 1971 (1). La présence de cette hormone a été confirmée de 1975 à 1977 dans les nids de guêpes (2),

dans le corps entier des abeilles (3) ainsi que dans la cire des rayons (4). L'action hyperglycémique de la noradrénaline et celle, plus puissante encore, de l'adrénaline furent mises en évidence peu après (5, 6). Pourtant, alors que Lecomte et coll. ont encore récemment mesuré des concentrations appréciables de noradrénaline dans l'abdomen, le thorax et la tête des abeilles (7), et que Owen et coll. ont pu caractériser certaines variations saisonnières des concentrations de la noradrénaline et de la dopamine dans le venin (8), il n'a été possible, jusqu'ici, de déceler la présence d'adrénaline chez aucun insecte. En revanche, un dérivé proche de la noradrénaline, l'octopamine, dont l'action hyperglycémiante a été mise en évidence depuis assez longtemps chez d'autres insectes (9), a été découvert dans le cerveau de l'Abeille, aux côtés de la noradrénaline, de la dopamine et de la sérotonine (10).

L'octopamine, présente dans le système nerveux de nombreux invertébrés (11), élève la tréhalosémie ainsi que la concentration en AMP cyclique du corps adipeux de la Blatte *in vitro* (12). La forme l paraît être chez le Criquet 10 fois moins active que la forme d sur la stimulation de l'oxydation du glucose, laquelle semble relever d'un mécanisme lié à des récepteurs α-adrénergiques (13). Il paraît en être de même pour l'élévation des concentrations en AMP cyclique, chez la Blatte, où l'octopamine, au lieu d'agir directement, semble déclencher plutôt la libération d'un facteur intermédiaire qui serait l'agent hyperglycémiant (14).

Le rôle de l'octopamine, comme effecteur physiologique lié au comportement, ne fait plus de doute chez les Orthoptères : un lien avec le grégarisme a d'abord été suggéré par David et Fuzeau-Braesch dès 1979 (15). Puis, Orchard et coll. ont montré que l'excitation provoquée par la manipulation des animaux *(Locusta migratoria)* élevait les concentrations en octopamine de l'hémolymphe (16), ce qui a été confirmé chez la Blatte par Bailey et coll. (17). Enfin, chez le Criquet comme chez la Blatte, les stimuli pouvant provoquer l'envol, une concordance a été mise en évidence entre les concentrations les plus élevées d'octopamine et les maximums d'activité locomotrice, c'est-à-dire les conditions nécessitant la libération de sources d'énergie métabolique (18, 19).

Chez l'Abeille, les récepteurs adrénergiques présentent une analogie assez marquée avec les formes β, étant donné la très forte activité de l'adrénaline elle-même et les effets inhibiteurs que présente le propranolol vis-à-vis de la noradrénaline (20). Il paraissait donc d'autant plus intéressant d'analyser la réponse octopaminergique au niveau de la glycémie, et de la comparer à celle des catécholamines, que Coulon et coll. (21) ont récemment mis en évidence, chez le Criquet, une voie possible de biosynthèse de la m-octopamine à partir de la l-dopa dont nous avons déjà caractérisé une activité hyperglycémiante plus faible que celle de la noradrénaline ou de l'adrénaline chez l'Abeille (5, 6).

Animaux et techniques. — Les abeilles ouvrières naissantes *(Apis mellifera, mellifera* L.*)* ont été prélevées dans les alvéoles encore operculés, peu avant leur émergence. Au cours des expériences, 270 insectes

d'un poids moyen individuel de 126,2 ± 2,9 mg ont été utilisés. Les abeilles ont reçu des injections de dl-octopamine (forme para-hydroxylée) à raison de 0,1 et 1 nanomole par individu, ainsi que de soluté physiologique (22) dans un volume total de 0,5 µl. Les injections de soluté ont été répétées avant et après celles de l'octopamine. Les abeilles ont été placées à l'obscurité à 21 ± 1° C aussitôt après les injections. Des prélèvements d'hémolymphe ont été opérés selon les techniques précédemment décrites (5, 6) au bout de 10 mn puis à intervalles de 45 mn pendant une période de 3 heures consécutive aux traitements. Les glucides ont été extraits et analysés à l'aide de techniques nanochromatographiques décrites ailleurs (23, 24, 25).

Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir de N = 3 à 6 mesures. Au moins 9 abeilles au total ont été soumises à une même dose pendant une même durée. Les probabilités de signification associées aux comparaisons de moyennes et aux valeurs des coefficients de corrélations ont été calculées d'après l'équation de « *t* » de Student.

Résultats. — Les mesures initiales de la glycémie effectuées chez des animaux témoins, au cours des expériences décrites, ont donné les valeurs suivantes (N = 3 mesures) :

glycémie : G_0 = 7,28 mM (σ = 1,29 mM),
tréhalosémie : T_0 = 35,25 mM (σ = 1,90 mM).

La figure 1 présente les variations de la tréhalosémie (exprimées en valeurs relatives à T_0) consécutives à l'injection des deux concentrations d'octopamine en solution dans le soluté physiologique, ainsi que de ce dernier, seul. Le traumatisme consécutif à la piqûre se traduit par un faible pic hypertréhalosémique (non significatif) apparaissant au bout de 10 mn suivi d'une diminution à 45 et 90 mn ($P < 0,0015$) et d'un retour à des fluctuations à un niveau non significativement différent des valeurs initiales aux points correspondant à 135 et 180 mn.

La plus faible dose d'octopamine ne provoque guère de variations par rapport aux valeurs initiales, si ce n'est une diminution à 180 mn, ($P = 0,09$). En revanche, les valeurs mesurées à 45 mn sont supérieures à celles obtenues après injection de soluté seul ($P = 0,015$).

La plus forte dose d'octopamine entraîne deux pics : le premier, après 10 mn, est significatif à la fois vis-à-vis de la valeur initiale ($P = 0,031$) et de celle mesurée avec la dose faible ($P = 0,007$). Le second, qui apparaît à 135 mn, est significatif vis-à-vis de la valeur initiale ($P = 0,07$) et de celles correspondant à l'injection de soluté seul ($P = 0,037$) et de la dose faible ($P = 0,06$). En revanche, les valeurs mesurées à 45 et 90 mn sont significativement inférieures à celles consécutives à l'injection de soluté seul (respectivement : $P = 0,017$ et $P = 0,039$), et chutent à 180 mn à une valeur inférieure à celle mesurée après injection de la plus faible dose ($P = 0,0015$).

La figure 2 présente les variations correspondantes de la glucosémie : l'injection de soluté physiologique entraîne deux pics, l'un à 10 mn,

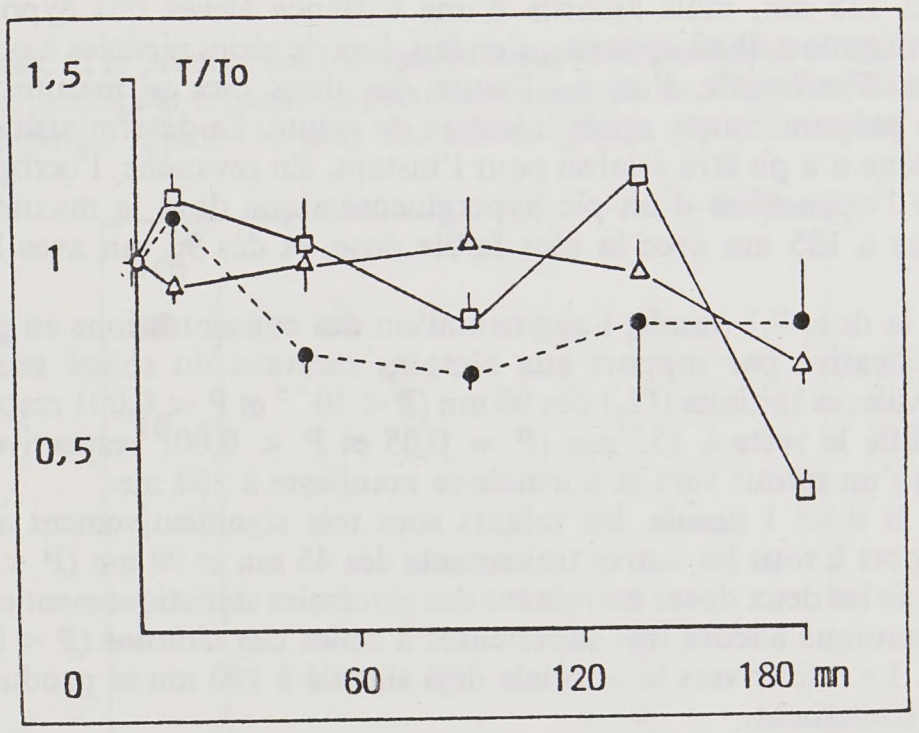


FIG. 1. — Cinétiques de variations de la tréhalosémie relative de l'Abeille (T) exprimée en proportion de la valeur initiale (T_0), après injection de soluté physiologique (- -●- -) et de dl-octopamine à raison de 0,1 nmole (—Δ—) et 1 nmole (—□—) par individu. Les écarts types proviennent de N = 3 mesures dans le cas de l'octopamine et N = 6 mesures dans celui du soluté seul.

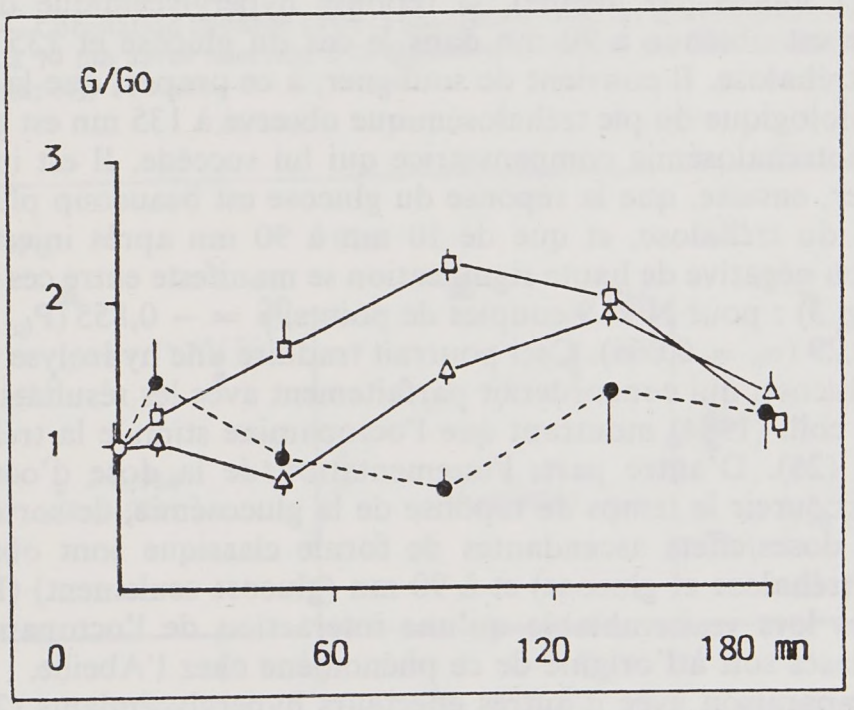


FIG. 2. — Cinétiques de variations de la glucosémie relative de l'Abeille (G) exprimée en proportion de la valeur initiale T_0, après injection de soluté (- - -●- - -) et de dl-octopamine, à raison de 0,1 nmole (—Δ—) et 1 nmole (—□—) par individu. Les écarts types proviennent de N = 3 mesures (octopamine) et N = 6 mesures (soluté).

l'autre à 135 mn, mais assortis d'une variance élevée qui hypothèque leur signification. Il est apparu qu'en fait, lors de séries répétées à quelques semaines d'intervalle, l'un ou l'autre des deux pics se manifestait de manière prépondérante, après injection de soluté. Le déterminisme de ce phénomène n'a pu être éclairci pour l'instant. En revanche, l'octopamine entraîne l'apparition d'un pic hyperglucosémique dont le maximum se manifeste à 135 mn avec la plus faible dose, et dès 90 mn avec la plus élevée.

Avec la dose 0,1 nmole, l'augmentation des concentrations en glucose est significative par rapport aux témoins recevant du soluté seul ainsi qu'aux valeurs initiales (G_0) dès 90 mn ($P < 10^{-5}$ et $P < 0,001$ respectivement). Elle le reste à 135 mn ($P = 0,05$ et $P < 0,001$ respectivement) tandis qu'un retour vers la normale se manifeste à 180 mn.

Avec la dose 1 nmole, les valeurs sont très significativement accrues par rapport à tous les autres traitements dès 45 mn et 90 mn ($P < 0,01$), tandis que les deux doses entraînent des glycémies statistiquement comparables, quoique encore très supérieures à celles des témoins ($P < 0,05$) à 135 mn. Le retour vers la normale déjà signalé à 180 mn se produit avec chaque traitement.

Discussion et conclusions. — Le traumatisme provoqué par l'injection de soluté physiologique se traduit par une libération de faibles quantités d'hormones endogènes, dont la principale manifestation correspond généralement à une response rapide de type adrénergique, ainsi que nous l'avions déjà constaté (5). Après injection de la plus forte dose d'octopamine (1 nmole par abeille), la réponse hyperglycémique d'intensité maximale est obtenue à 90 mn dans le cas du glucose et 135 mn dans celui du tréhalose. Il convient de souligner, à ce propos, que la signification physiologique du pic tréhalosémique observé à 135 mn est confirmée par l'hypotréhalosémie compensatrice qui lui succède. Il est intéressant d'observer, ensuite, que la réponse du glucose est beaucoup plus intense que celle du tréhalose, et que de 10 mn à 90 mn après injection, une corrélation négative de haute signification se manifeste entre ces deux glucides (Fig. 3) : pour $N = 9$ couples de points, $\rho = -0,855$ ($P_{(\rho)} = 0,003$) $b = -0,29$ ($\sigma_b = 0,066$). Ceci pourrait traduire une hydrolyse du tréhalose en glucose, qui concorderait parfaitement avec les résultats de Jahagirdar et coll. (1984) montrant que l'octopamine stimule la tréhalase de la Blatte (26). D'autre part, l'augmentation de la dose d'octopamine paraît raccourcir le temps de réponse de la glucosémie, de sorte que des relations doses/effets ascendantes de forme classique sont observées à 135 mn (tréhalose et glucose) et à 90 mn (glucose seulement) (Fig. 4). Il paraît dès lors vraisemblable qu'une interaction de l'octopamine avec les tréhalases soit à l'origine de ce phénomène chez l'Abeille.

La comparaison avec d'autres effecteurs hyperglycémiants (22) révèle une analogie partielle entre la réponse de l'octopamine et celle du glucagon, dont le second pic (le plus marqué pour le tréhalose dont l'hydrolyse ne paraît alors pas être stimulée) se produit également après 135 mn. En

revanche, ni le premier pic (45 mn) induit par le glucagon, et qui coïncide avec la principale réponse hypertréhalosémique de l'AMP cyclique (22), ni la réponse rapide (10 mn) des adrénergiques (5) ne trouvent d'équi-

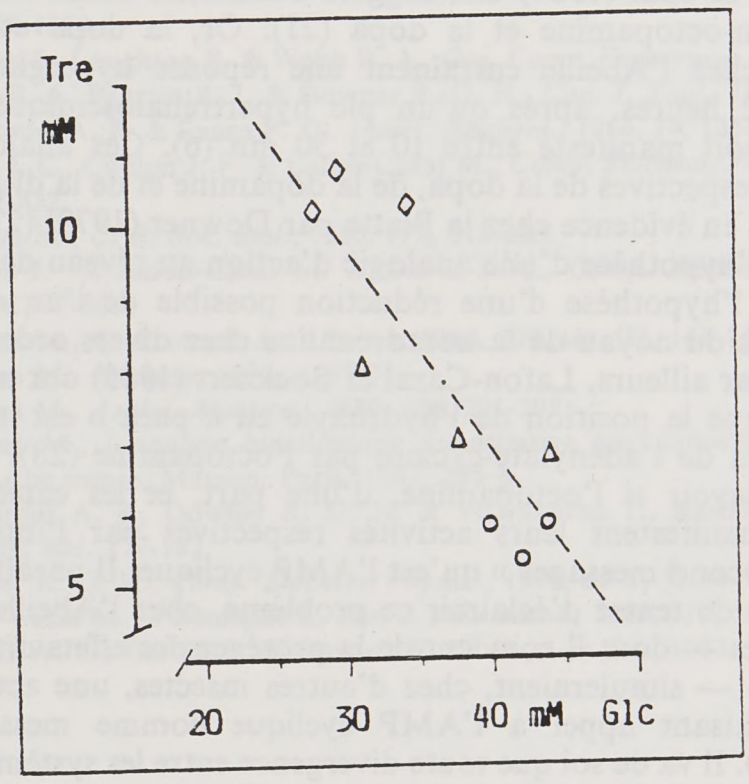


FIG. 3. — Corrélation apparue entre la glucosémie (Glc) et la tréhalosémie (Tre) (mM) de 10 mn à 90 mn après injection d'octopamine (1 nmole par individu). (o) : 10 mn; (Δ) : 45 mn; (◇) : 90 mn.

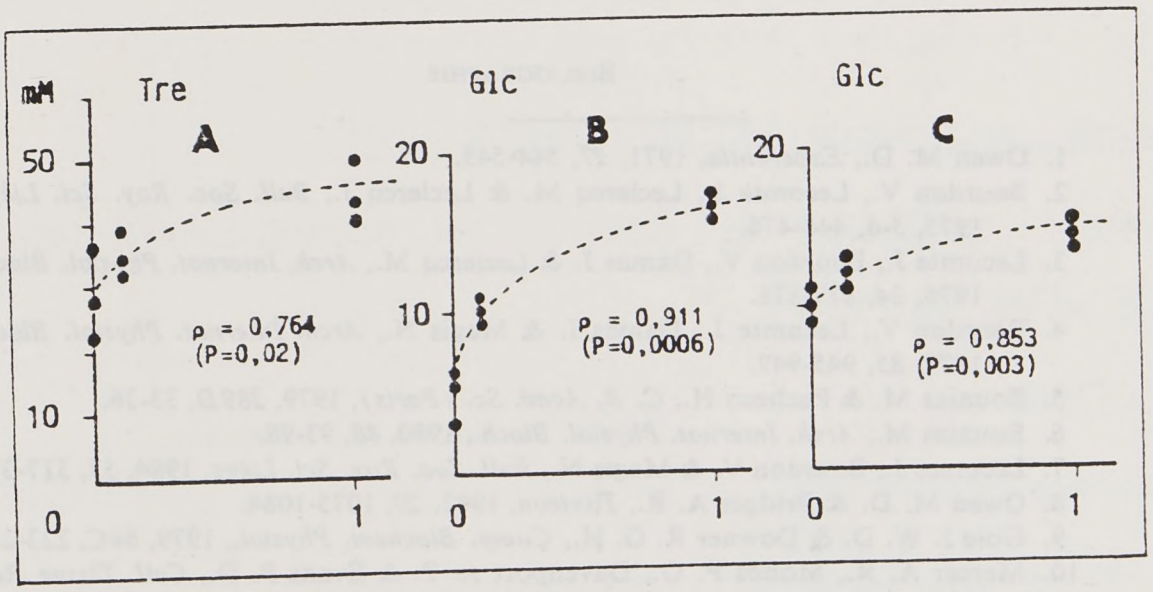


FIG. 4. — Relations doses/effets observées pour le tréhalose à 135 mn (A) et pour le glucose à 90 mn (B) et à 135 mn (C). Tre, Glc : tréhalosémie, glucosémie (mM); en abscisse : doses en nanomoles par abeille.

valent avec l'octopamine dont l'activité hyperglycémiante reste, curieusement, très inférieure à celle de l'adrénaline, comme si cet agoniste avait disparu au cours de l'évolution tandis que ses récepteurs auraient subsisté en leur état primitif.

Coulon et coll. (1984) ont suggéré l'existence d'un lien métabolique entre la m-octopamine et la dopa (21). Or, la dopa et la dopamine injectées chez l'Abeille entraînent une réponse hyperglucosémique au bout de 2 heures, après qu'un pic hypertréhalosémique relativement faible se soit manifesté entre 10 et 30 mn (6). Ces analogies entre les réponses respectives de la dopa, de la dopamine et de la dl-p-octopamine, déjà mises en évidence chez la Blatte par Downer (1979) (27), suggèrent à leur tour l'hypothèse d'une analogie d'action au niveau des récepteurs et soulèvent l'hypothèse d'une réduction possible de l'un ou l'autre des hydroxyles du noyau de la noradrénaline chez divers ordres d'Insectes : comme, par ailleurs, Lafon-Cazal et Bockaert (1985) ont montré, chez le Criquet, que la position de l'hydroxyle en « para » est indispensable à l'activation de l'adénylate-cyclase par l'octopamine (28), la question se pose de savoir si l'octopamine, d'une part, et les catécholamines de l'autre, manifestent leurs activités respectives par l'intermédiaire du même « second messager » qu'est l'AMP cyclique. Il paraît d'autant plus important de tenter d'éclaircir ce problème, chez l'Abeille, que certains insecticides — dont il convient de la protéger des effets dits « non intentionnels » — simuleraient, chez d'autres insectes, une action de l'octopamine faisant appel à l'AMP cyclique comme messager intermédiaire (29). Il va de soi que toute divergence entre les systèmes hormonaux aminergiques de l'Abeille et ceux des autres ordres d'Insectes ne pourrait qu'être exploitée avec profit dans le sens de la recherche d'une sélectivité favorable à la protection des Hyménoptères pollinisateurs, précieux auxiliaires de l'agriculture.

Bibliographie

1. Owen M. D., *Experentia*, 1971, *27*, 544-545.
2. Bourdon V., Lecomte J., Leclercq M. & Leclercq J., *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 1975, *5-6*, 444-476.
3. Lecomte J., Bourdon V., Damas J. & Leclercq M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1976, *84*, 877-878.
4. Bourdon V., Lecomte J., Damas J. & Magis N., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1977, *85*, 945-947.
5. Bounias M. & Pachéco H., *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1979, *289D*, 33-36.
6. Bounias M., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1980, *88*, 93-98.
7. Lecomte J., Bourdon V. & Magis N., *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 1984, *53*, 317-322.
8. Owen M. D. & Bridges A. R., *Toxicon*, 1982, *20*, 1075-1084.
9. Gole J. W. D. & Downer R. G. H., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *64C*, 223-226.
10. Mercer A. R., Mobbs P. G., Davenport A. P. & Evans P. D., *Cell. Tissue Res.*, 1983, *234*, 655-677.
11. Robertson H. A. & Juorio A. V., *Int. Rev. Neurobiol.*, 1976, *19*, 173-224.

12. Gole J. W. D. & Downer R. G. H., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *64 C*, 223-226.
13. Goosey M. W. & Candy D. J., *Biochem. Soc. Transact.*, 1980, *8*, 532-533.
14. Downer R. G. H., Orr G. L., Gole J. W. D. & Orchard I., *J. Insect. Physiol.*, 1984, *30*, 457-462.
15. David J. C. & Fuzeau-Braesch S., *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1979, *288*, sér. D, 1207-1210.
16. Orchard I., Loughton B. & Webb R. A., *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1981, *45*, 175-180.
17. Bailey B. A., Martin R. J. & Downer R. G. H., *Can. J. Zool.*, 1984, *62*, 19-22.
18. Davenport A. P. & Evans P. D., *Insect. Biochem.*, 1984, *14*, 135-143.
19. David J. C., Coulon J. F. & Lafon-Cazal M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, *82 C*, 427-432.
20. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, *179*, 218-223.
21. Coulon J. F., Lafon-Cazal M. & David J. C., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1984, *78 C*, 77-80.
22. Bounias M., *C. R. Acad. Sc. (Paris)*, 1986, *302*, sér. III, 141-144.
23. Bounias M., *Analusis*, 1976, *4*, 87-93.
24. Bounias M., *Analyt. Biochem.*, 1980, *106*, 291-295.
25. Bounias M., L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince, Masson, Paris, 1983, 205 p.
26. Jahagirdar A. P., Downer R. G. H. & Viswanatha T., *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, *801*, 177-183.
27. Downer R. G. H., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *62 C*, 31-34.
28. Lafon-Cazal M. & Bockaert J., *Eur. J. Pharmacol.*, 1985, *119*, 53-59.
29. Gole J. W. D., Orr G. L. & Downer R. G. H., *Life Sci.*, 1983, *32*, 2939-2947.

Communication de synthèse :

Colloque International "Invertebrate Peptides and Amines", Bordeaux, 16-17 Avril 1986

Control by aminergic and peptidergic hormones of the relationships between haemolymph lipids and carbohydrates in the honeybee.

The honeybees hyperglycemic responses to in vivo hormone injections occur within 10-45 min. with noradrenaline (NrAd) and after 2 hrs with octopamine (Octp) and glucagon (Gcgn), both these peaks being elicited by cAMP injections. Bees insulin (Insl) promptly depresses the glycemia. Among lipids, phospholipids (PL), steroids (St) and 1-2 diacylglycerol (DG) are correlated with carbohydrates following injections with cAMP, Octp and Insl. (positively) or Gcgn (negatively) but not with NrAd which, together with Insl., rises fatty acid (FA) levels and depresses PL, DG and St. Negative correlations between FA and glucose induced by Insl and Octp are suppressed respectively in presence of somatostatin (Sm) and propranolol (Prpl). Prpl counteracts NrAd and Octp but not Gcgn effects on the glycemia, and Octp but not NrAd and only moderately Gcgn effects on lipids. Sm does not affect cAMP and NrAd induced hyperglycemia, but reverses the effects of Gcgn and also of Octp. Sm reverses the lipemic effects of Gcgn, but also of cAMP, Octp and to a lesser extent NrAd. Sm rather acts on peptides and Prpl on amines, but interactions also occur between them, and the results support the hypothesis that lipids and carbohydrates are differentially controlled during aminergic and peptidergic agonistic or antagonistic actions.

(Publication prévue par Cambridge University Press).

B - ENZYMOLOGIE THEORIQUE ET EXPERIMENTALE.

1 - ANALYSE CINETIQUE DES ENZYMES NON MICHAELIENNES INHIBABLES PAR LEURS SUBSTRATS.

INTRODUCTION

De nombreux pesticides (et en particulier les organo-phosphorés) sont actifs sur les acétylcholinestérases (AChE) qui constituent, dans la lutte contre les insectes, une cible à laquelle l'abeille est malheureusement exposée.

Or, d'une part les AChE de l'abeille sont inhibées par un excès d'acétylcholine (Mehrotra et Phokela, 1980), et d'autre part, les AChE étudiées sur divers animaux s'avèrent non michaëliennes : le fait a été reconnu par certains auteurs (Foidart et Gridelet,

1974) mais ignoré par d'autres (Brufani et Pomponi, 1986). A partir des données numériques fournies dans leurs publications respectives, nous avons pu montrer que les coefficients de Hill apparents des AcChE pouvaient atteindre des valeurs allant de 1,2 à 1,4 (fig. 1 et 2).

Si des agglomérats enzymatiques peuvent conduire à une pseudo-coopérativité apparente négative (qui pourrait expliquer certains autres résultats récents sur les AChE : Soylemez et Ozer, 1985), le calcul algébrique montre que la présence de plusieurs formes enzymatiques simultanément actives sur un substrat ne peut pas, au contraire, simuler une coopérativité négative.

Il paraissait donc important de développer les bases nécessaires dans le cas d'enzymes coopératives inhibables par leurs substrats, car tel pourrait être le cas des propriétés des AChE d'abeilles.

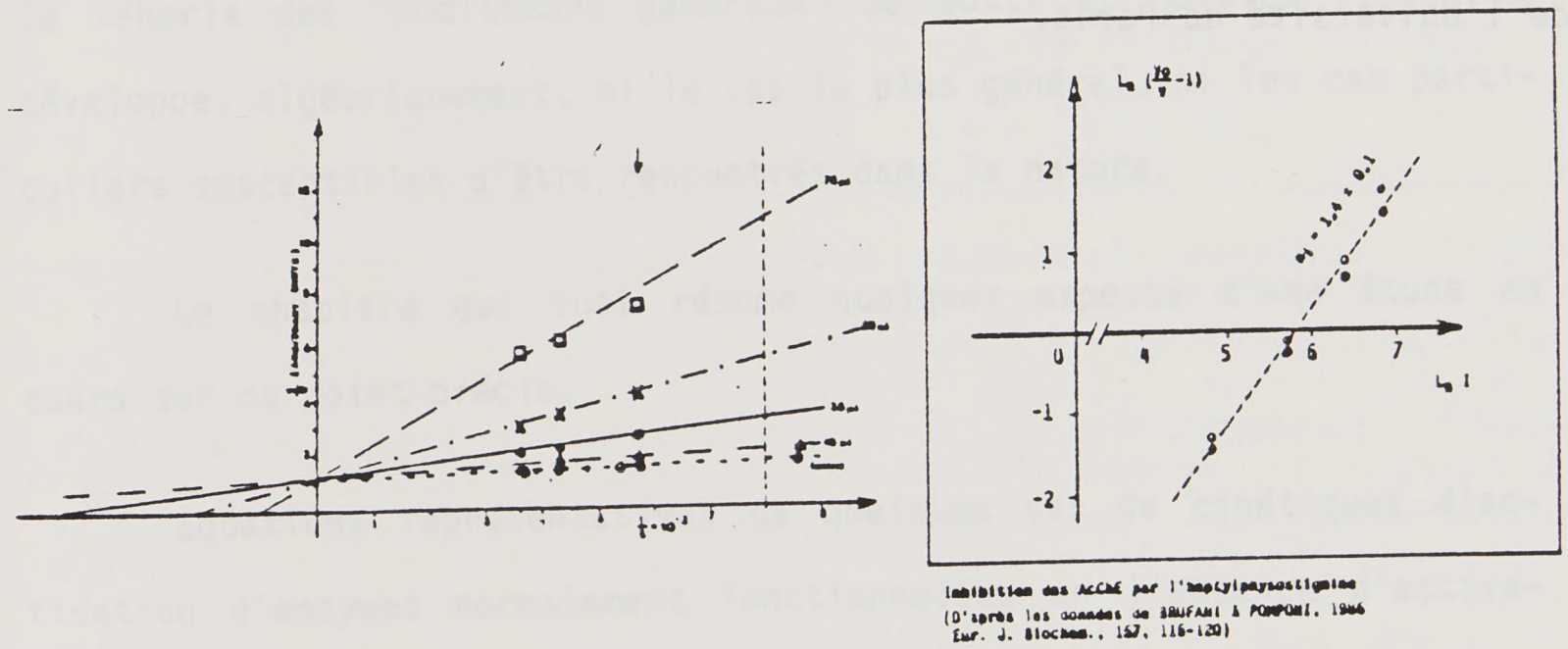


Fig. 1 - Analyse des données de Brufani et Pomponi (Eur. J. Biochem. 157, 1986, 115) : A : représentation $v^{-1}=f(s^{-1})$ traitée par les auteurs comme michaëlienne a priori. B : représentation de Chou (pour la valeur S indiquée par une flèche en A) mettant en évidence une coopérativité positive.

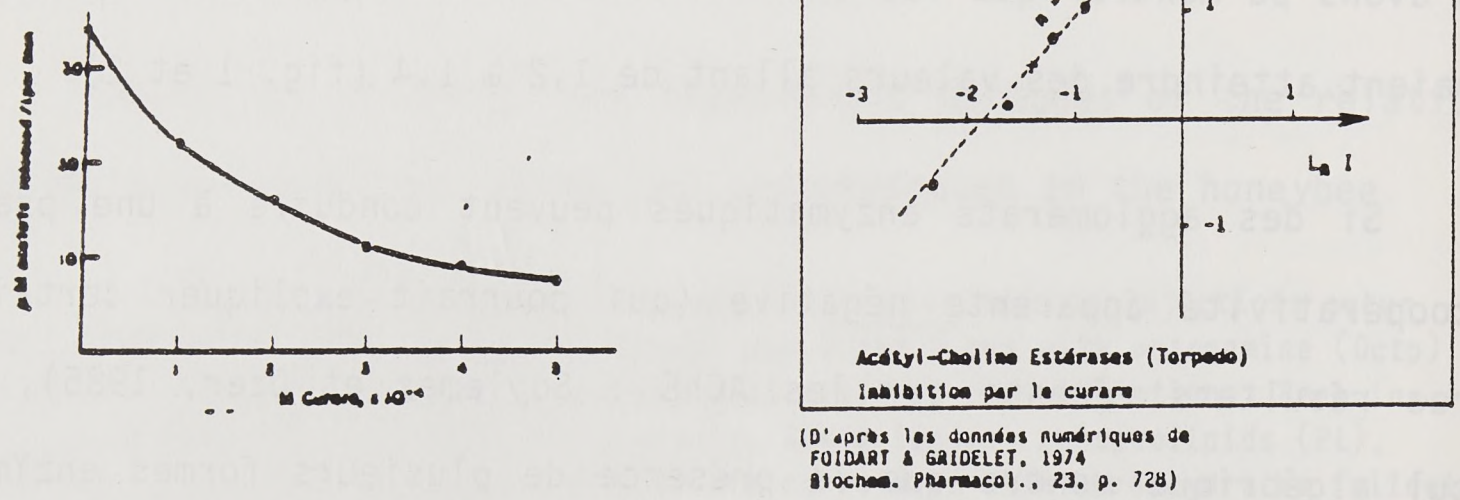


Fig. 2 - Analyse des données de Foidart et Gridelet (Biochem. Pharmacol., 23, 1974, 728) : en A, données des auteurs. En B : représentation de Chou révélant une coopérativité positive. .

Un mini séminaire sur ce sujet a été organisé en Avignon le 19 décembre 1986 à l'occasion de la venue du Dr. LENOIR-ROUSSEAUX, de l'Université de Paris.

2 - ACTIVATION ENZYMATIQUE

L'intérêt d'étudier les interactions directes entre enzymes et hormones avait été souligné, sous forme de projet, dès 1978 (C.R. Annuel Trav. Lab. Biochimie, 7, 1978, p. 51) mais n'avait pu avoir de suite faute de moyens (bourses d'accueil d'étudiants).

Récemment (Jahagirdar, Downer et Wiswanatha, 1984) l'activation possible des tréhalases d'insectes par l'octopamine a été suggérée, tandis que l'activation des AChE par de faibles concentrations de solvants organiques est connue depuis longtemps (Dauterman et al. 1962, Colhoun, 1961, Kunkee et Zweig 1963, Lewis 1967). Un neuro-peptide, la substance P, stimule également les AChE à partir d'une activité basale significative (Catalan et al., 1984).

Or, les modèles cinétiques les plus connus (cf Downer, 1979) s'appliquent au cas d'enzymes primitivement inactives, tandis que la téhorie des "modifieurs généraux" de Botts et Morales (1952) ne développe, algébriquement, ni le cas le plus général, ni les cas particuliers susceptibles d'être rencontrés dans la nature.

Le chapitre qui suit résume quelques aspects d'une étude en cours sur ce point précis.

Equations représentatives de quelques cas de cinétiques d'activation d'enzymes normalement fonctionnelles en l'absence d'activateur. Note de Michel BOUNIAS.

MECANISMES MOLECULAIRES - La figure 1 illustre une série d'interactions possibles. Dans le cas général (fig. 1-A) l'activateur (A) peut se fixer sur deux sites distincts de l'enzyme (E), soit sous la forme libre, soit sous forme de complexe avec le substrat (ES). La figure 1-B illustre le même processus restreint au cas où l'enzyme

ne peut se fixer que sur un seul et même site de (E) ou de (ES). Ces deux cas conduisent à la formation de deux complexes (EAS et ESA) ou d'un seul (AES), dont la dissociation en produits (P) s'effectue avec une vitesse supérieure à celle

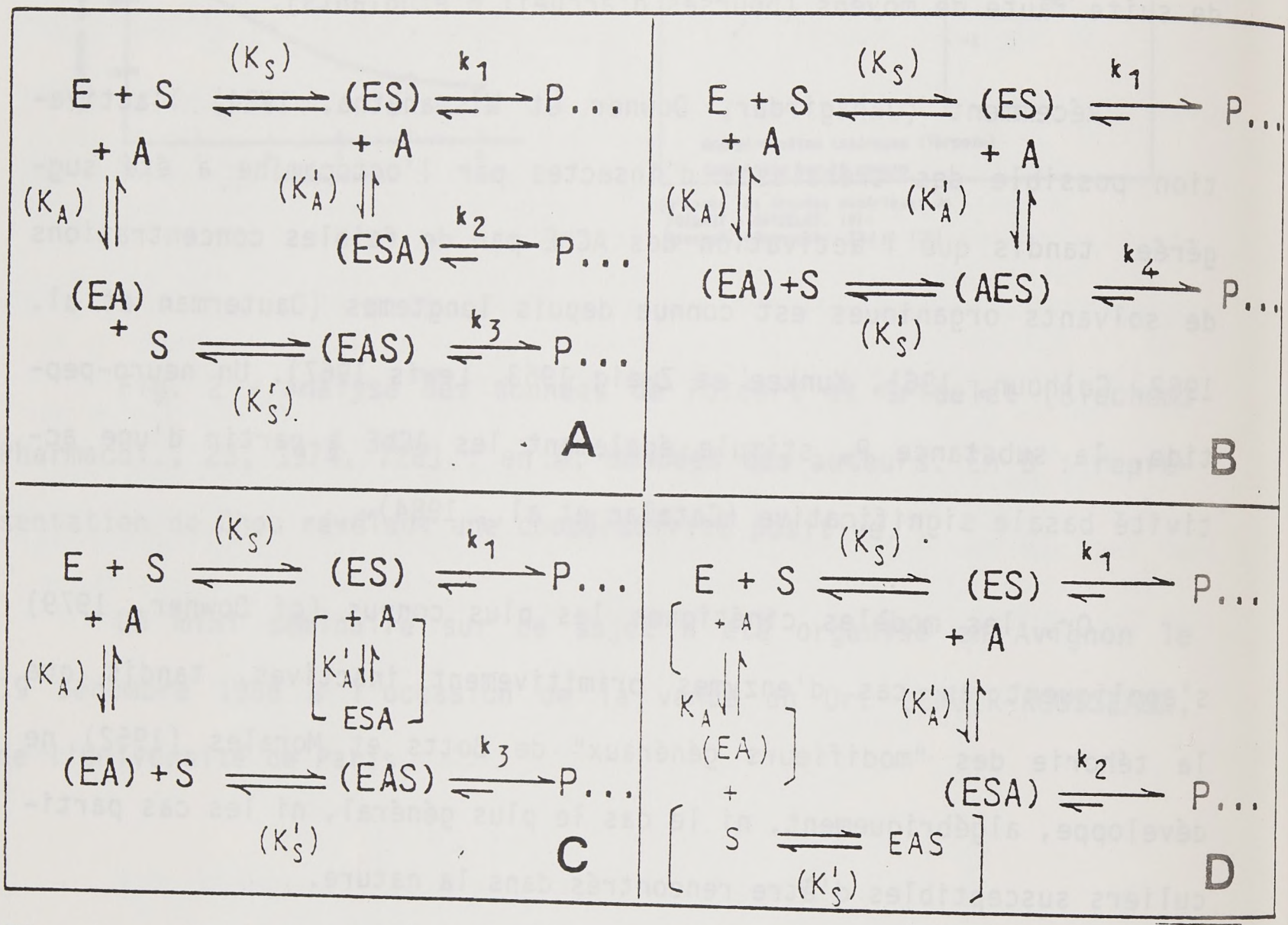


Fig. 1 . - Schémas réactionnels correspondant aux principaux cas d'activation envisageable : A = cas général comportant deux sites pour l'activateur. B = cas général réduit à un seul site pour l'activateur. C = cas pseudo-compétitif. D = cas pseudo-incompétitif. En C et D figurent entre crochet les cas d'un complexe incompétent.

de la dissociation du complexe initial (ES). Deux cas particuliers sont à envisager : celui où l'activateur ne se fixerait que sur la forme libre de l'enzyme (cas pseudo-compétitif, fig. 1-C) et celui ou l'activateur ne se fixerait que sur le complexe (ES) dont il stimulerait la dissociation en produits (cas pseudo-incompétitif, incompétitif, fig. 1-D).

Enfin, les cas où l'un des complexes (ESA ou EAS) correspondant au cas général serait incompétent, le mécanisme apparaîtrait comme une extension des deux cas particuliers précédents, où l'activation serait modulée par un phénomène superposé d'inhibition partielle par l'activateur.

EQUATIONS REPRESENTATIVES. - Les constantes cinétiques k_1, k_2, k_3, k_4 définissent les vitesses d'apparition des produits à partir de chacun des complexes compétents : ES, ESA, EAS et AES. Les constantes de dissociation des complexes ES et EA sont respectivement :

$$K_S = \frac{(E)(S)}{(ES)} \text{ [1] et } K_A = \frac{(E)(A)}{(EA)} \text{ [2]}$$

a) cas général (G)(fig. 1-A). Les vitesses initiales de libération des produits à partir des trois complexes compétents en présence sont les suivantes : $v_o = K_1(ES)$ [3] ; $v_A = K_2(ESA)$ [4] ; $v_B = K_3(EAS)$ [5]. Les constantes de dissociation des complexes ESA et EAS sont :

$$K'_S = \frac{(EA)(S)}{(EAS)} \text{ [6]} \; ; \; K'_A = \frac{(ES)(A)}{(ESA)} \text{ [7]}$$

Des relations [1][2][6][7], il découle : $\frac{K_S K'_A}{K'_S K_A} = \frac{(ESA)}{(EAS)}$ [8]

La vitesse de réaction résultante, v_R est la somme des contributions des vitesses attribuées à chacun des complexes, soit $v_R = v_o + v_A + v_B$ et l'expression des vitesses maximales correspondantes suppose l'engagement simultané sous forme de complexe compétent, de toutes les espèces moléculaires contenant l'enzyme, soit E_T = (E+ES+EA+EAS+ESA). Les vitesses maximales correspondant à la dissociation de chacun des trois complexes actifs s'écrivent :

$V_{M_B} = k_1(E_T)$; $V_{M_A} = k_2(E_T)$; $V_{M_B} = k_3(E_T)$

Le remplacement de E_T par son expression développée, et celui des différents termes par leurs valeurs tirées des relations [1][2][6][7] conduit

à l'équation suivante, décrivant la cinétique correspondant au cas général (fig. 1-A) :

$$V_R = \frac{\dfrac{V_{M_o}}{1 + A\left(\dfrac{1}{K'_A} + \dfrac{K_S}{K_A K'_S}\right)} \cdot S}{\dfrac{K_S\left(1 + \dfrac{A}{K_A}\right)}{1 + A\left(\dfrac{1}{K'_A} + \dfrac{K_S}{K_A K'_S}\right)} + S} + \frac{\dfrac{V_{M_A}}{1 + \dfrac{K'_A K_S}{K_A K'_S} + \dfrac{1}{A} \cdot K'_A} \cdot S}{\dfrac{K'_A K_S\left(\dfrac{1}{A} + \dfrac{1}{K_A}\right)}{1 + \dfrac{K'_A K_S}{K_A K'_S} + \dfrac{1}{A} K'_A} + S} + \frac{\dfrac{V_{M_B}}{1 + \dfrac{K_A K'_S}{K'_A K_S} + \dfrac{1}{A}\dfrac{K'_S K_A}{K_S}} \cdot S}{\dfrac{K'_S\left(\dfrac{1}{A} + \dfrac{1}{K_A}\right)}{1 + \dfrac{K_A K'_S}{K'_A K_S} + \dfrac{1}{A}\dfrac{K'_S K_A}{K_S}} + S}$$

b) Cas restreint (R)(fig. 1-B).- Un seul complexe compétent (AES) comporte les trois espèces moléculaires en présence. Ses constantes de dissociation s'écrivent :

$$K'_S = \frac{(EA)(S)}{(AES)} \quad [10] \quad \text{et} \quad K'_A = \frac{(ES)(A)}{(AES)} \quad [11]$$

d'où il découle, compte tenu des relations [1] et [2] :

$K_S K'_A \,/\, K'_S K_A = 1$ [12] ce qui ne saurait être confondu avec la forme particulière du cas précédent où les deux espèces moléculaires EAS et ESA, tout en restant distinctes, atteindraient des concentrations égales, à l'équilibre.

La vitesse initiale de libération des produits est $v_A = k_4 (AES)$ et la vitesse maximale correspondante $V_{M_B} = k_4 (E_T)$ d'où découle l'équation représentative suivante, qui peut-être considérée comme s'appliquant également au schéma de Botts et Morales (7) ...

$$v_R = \frac{\dfrac{V_{M_0}}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} \cdot S}{\dfrac{K_S\,(1 + \dfrac{A}{K_A})}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} + S} + \frac{\dfrac{V_{M_A}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} \cdot S}{\dfrac{K'_S\,(1 + \dfrac{K_A}{A})}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} + S} \qquad [13]$$

c) Cas particulier pseudo-compétitif (Cm)(fig. 1-C). Seul le complexe activé E est formé, l'activateur ne pouvant se fixer que sur l'enzyme libre. La constante K'_A n'a plus de valeur numérique finie. Le rapport des trois autres constantes s'écrit alors : $K_S/K'_S K_A = (ES)/(A)$ [14]. Les vitesses initiales sont $v_0 = k_1(ES)$ et $v_A = k_4(E)$ et l'équation représentative s'écrit :

$$v_R = \frac{\dfrac{V_{M_0}}{1 + \dfrac{K_S}{K'_S K_A} A} \cdot S}{\dfrac{K_S\,(1 + \dfrac{A}{K_A})}{1 + \dfrac{K_S}{K'_S \cdot K_A} A} + S} + \frac{\dfrac{V_{M_B}}{1 + \dfrac{K'_S K_A}{K_S} \cdot \dfrac{1}{A}} \cdot S}{\dfrac{K'_S\,(1 + \dfrac{K_A}{A})}{1 + \dfrac{1}{A} \cdot \dfrac{K'_S K_A}{K_S}} + S} \qquad [15]$$

(la constante K'_A est remplacée par $K'_S \cdot K_A/K_S$ dans l'équation [13])

La formation secondaire d'un complexe ESA inactif ($k_2 = 0$) constitue un dérivé du modèle ci-dessus. Son équation dérive simplement de celle du cas général (G) à deux sites de l'activateur (éq. [9]), dans laquelle $V_{M_A} = 0$.

d) Cas particulier pseudo-incompétitif (Im). - L'activateur ne peut agir qu'en se fixant sur le complexe formé entre l'enzyme et le substrat. La

constante K_A n'a pas de valeur finie, et la constante K'_S est nulle ([EA]=0) ou indéfinie. La vitesse résultante s'écrit : $v_R = k_1(ES) + k_2(ESA)$, et la concentration totale en enzyme étant : $E_T = (E+ES+ESA)$, l'équation représentative du phénomène est la suivante :

$$v_R = \frac{\dfrac{V_{M_0}}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} \cdot S}{\dfrac{K_S}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} + S} + \frac{\dfrac{\dfrac{V_{M_A}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} \cdot S}{\dfrac{K_S K'_A}{A}}}{\dfrac{1 + \dfrac{K'_A}{A}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} + S} \qquad [16]$$

Dans le cas dérivé où l'activateur pourrait se fixer sur l'enzyme, deux éventualités sont envisageables : soit les réactions conduisent à un complexe EAS inactif, et l'équation représentative s'obtient en annulant V_{M_B} dans l'équation [9] ; soit le complexe EA est lui-même inactif, et dans ce cas, la constante K'_S n'a pas de valeur finie et l'équation devient :

$$v_R = \frac{\dfrac{V_{M_0}}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} \cdot S}{\dfrac{K_S\left(1 + \dfrac{A}{K'_A}\right)}{1 + \dfrac{A}{K'_A}} + S} + \frac{\dfrac{\dfrac{V_{M_A}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} \cdot S}{K_S K'_A\left(\dfrac{1}{K_A} + \dfrac{1}{A}\right)}}{\dfrac{1 + \dfrac{K'_A}{A}}{1 + \dfrac{K'_A}{A}} + S} \qquad [17]$$

PROPRIETES REMARQUABLES DES EQUATIONS D'ACTIVATION . - La forme générale des équations peut être écrite de manière simplifiée, dans le cas général:

$$v_R = \frac{U_0 S}{h_0 + S} + \frac{U_A \cdot S}{h_S + S} + \frac{U_B \cdot S}{h_B + S} \qquad [18]$$

Il s'agit d'une cinétique à trois composantes superposées, mais dans lesquelles le calcul montre aisément que les constantes résultantes respectives sont algébriquement identiques, soit $h_o = h_A = \overbrace{h_B}^{=h}$ d'où la forme finale : $v_R = [U_o + U_A + U_B]\ S\ /\ (\ h + S\ )$ [19].

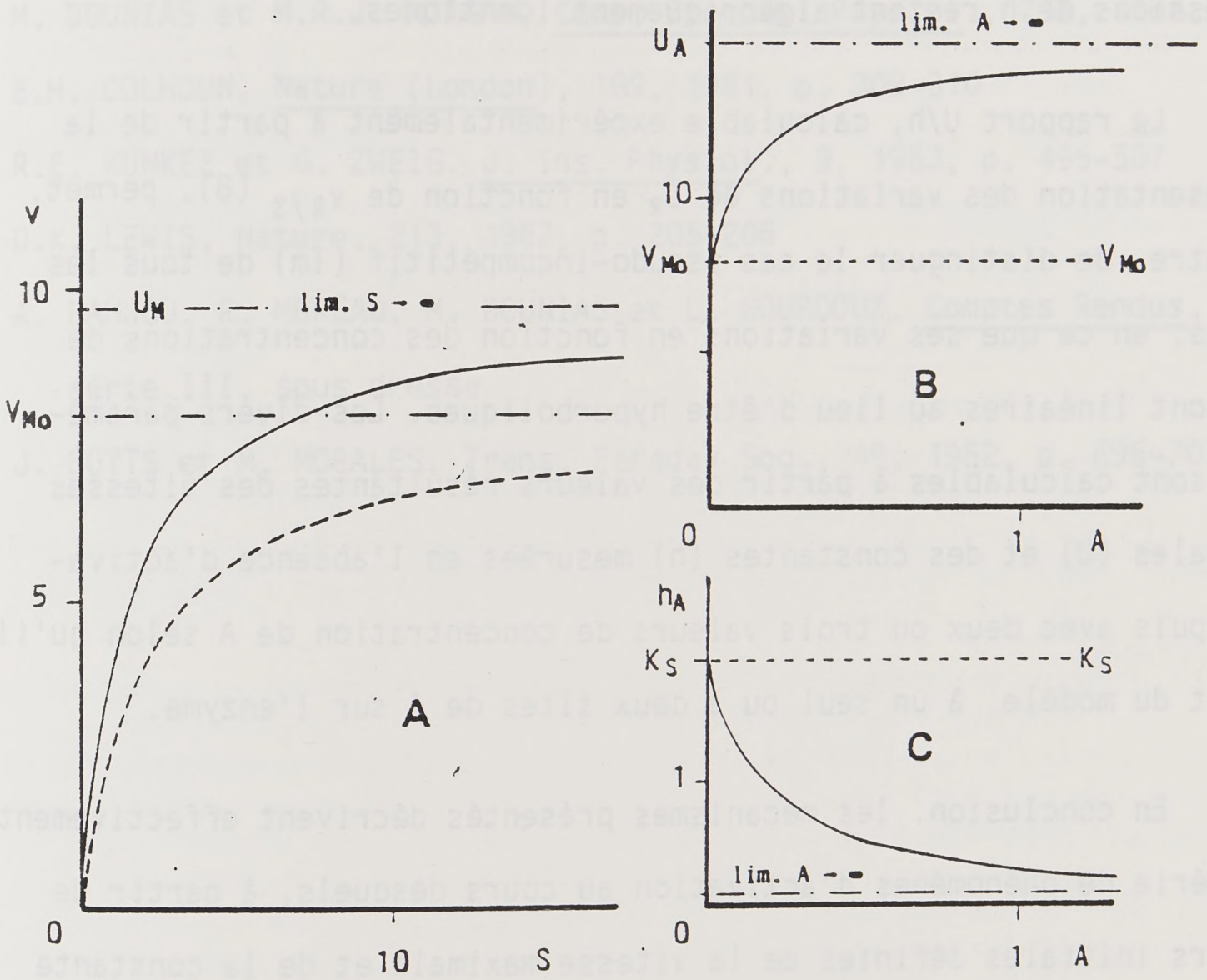


Fig. 2 . - Influence de l'activation (cas général) sur les propriétés cinétiques de la réaction reconstituée au moyen des valeurs suivantes : V_{M_o} = 8 unités ; V_{M_A} = 12 unités ; V_{M_B} = 16 unités ; k_S = 2 mM ; K'_S = 0,1 mM ; K_A = 4 mM ; K'_A = 0,5 mM. (A) = courbes de saturation pour A = 0,05 mM ; (B) = influence de la concentration en activateur A (mM) sur la vitesse résultante U_A, pour [S] = 1 mM. (C) = influence de [A](mM) sur la constante résultante h_A (mM), pour [S] = 1 mM

La figure 2 illustre l'allure des courbes expérimentales pouvant être déduites des variations de v_R en fonction de [S], et de celles des expressions U et h en fonction de [A]. Les cas restreint (R) et particuliers (Cm et Im) se résument à un système à deux composants U_o et $U_{(A\ ou\ B)}$ au lieu de trois, dans lequel les valeurs des expressions de h restent algébriquement identiques.

Le rapport U/h, calculable expérimentalement à partir de la représentation des variations de U_R en fonction de $v_{R/S}$ (8), permet, en outre, de distinguer le cas pseudo-incompétitif (Im) de tous les autres, en ce que ses variations en fonction des concentrations de [A] sont linéaires au lieu d'être hyperboliques. Les divers paramètres sont calculables à partir des valeurs résultantes des vitesses maximales (U) et des constantes (h) mesurées en l'absence d'activateur puis avec deux ou trois valeurs de concentration de A selon qu'il s'agit du modèle à un seul ou à deux sites de A sur l'enzyme.

En conclusion, les mécanismes présentés décrivent effectivement une série de phénomènes d'activation au cours desquels, à partir de valeurs initiales définies de la vitesse maximale et de la constante du substrat, la première tend à augmenter et la seconde à diminuer, jusqu'à tendre vers des valeurs limites théoriques si la concentration en activateur augmente vers l'infini. Ces particularités paraissent rendre compte, en première analyse, de certaines observations expérimentales (6) dont elles devraient permettre une étude plus complète.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] A. CORNISH-BOWDEN, Fundamentals of Enzyme kinetics, Butterworth and Co, 1979, p. 85-89

[2] M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN, Comp. Biochem. Physiol., 79B, 1984, 75-80

[3] E.H. COLHOUN, Nature (London), 189, 1961, p. 309-310

[4] R.E. KUNKEE et G. ZWEIG, J. Ins. Physiol., 9, 1963, p. 495-507

[5] D.K. LEWIS, Nature, 213, 1967, p. 205-206

[6] A. BAHJOU, R. MOREAU, M. BOUNIAS et L. GOURDOUX, Comptes Rendus, 1986, série III, sous presse

[7] J. BOTTS et M. MORALES, Trans. Faraday Soc., 49, 1952, p. 696-707

REGULATEUR BIPHASIQUES

(Cadre : Université d'Avignon)

La régulation de la thréonine désaminase par l'isoleucine (Sanchez et Changeux, 1966), celle de la phosphatase neutre de l'orge par la leucine (Bounias et Pachéco, 1972), ou encore celle de l'activité hyperglycémiante du glucagon par la somatostatine (Rosa et al., 1982) relèvent d'un contrôle mixte (biphasique) qui ne semble pas avoir été décrit jusqu'ici.

Un modèle moléculaire a été élaboré en cours d'année et a conduit à une équation de la forme :

$$v_R = \frac{(U_O + U_A)S}{h + S}$$

dans laquelle U et h sont des fonctions de R, R^2 et R^{-1} et où interviennent deux expressions de vitesses maximales et 7 constantes de dissociation.

La fig. 1 montre que l'équation rend effectivement compte des phénomènes observés. Les résultats actuels ont été déposés sous pli cacheté et l'étude sera poursuivie en 1987.

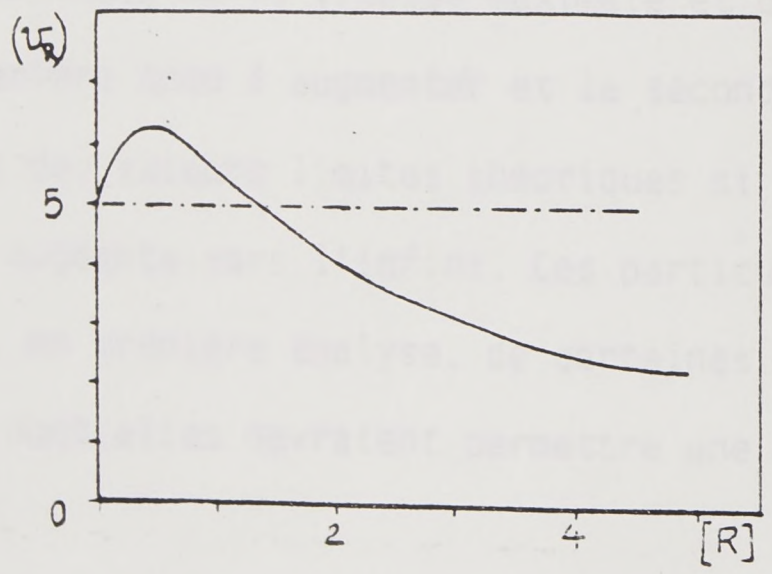


Fig. 1 - Variations d'une vitesse enzymatique résultante (v_R) en fonction des concentrations en régulateur (R) pour une valeur fixe de la concentration en substrat. Dans l'exemple ci-dessus, S=1 unité. Les valeurs des constantes de dissociation sont toutes fixées à 1 unité et celles des vitesses maximales à 10 et 24 unités respectivement.

3 - INTERACTIONS HORMONES/ENZYMES

Les travaux présentés ci-dessous constituent une première approche. Ils se poursuivront en 1987 par une étude cinétique très détaillée.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 303, Série III, n° 16, 1986 655

BIOCHIMIE GÉNÉRALE. — *Interaction moléculaire in vitro d'une substance apparentée à l'insuline avec l'activité tréhalasique du corps gras du Coléoptère Tenebrio molitor L.* Note de **Ahmed Bahjou, Robert Moreau, Michel Bounias, Lucienne Gourdoux** et **Janine Dutrieu,** présentée par Jean Roche.

Une hormone insulino-semblable extraite du mésentéron du Coléoptère *Tenebrio molitor* est capable d'activer la tréhalase du corps gras de l'insecte *in vitro*, en agissant soit directement sur des extraits enzymatiques, soit après incubation préalable avec les corps gras isolés. Le mécanisme se traduit par une augmentation de la vitesse maximale, fonction des doses croissantes d'hormone, ainsi qu'une diminution de la constante de dissociation. Ni l'insuline bovine, ni l'hormone lipo-mobilisatrice, ni les extraits de *corpora cardiaca* ne présentent d'effets analogues.

GENERAL BIOCHEMISTRY. — *In vitro* molecular interaction of an insulin-like factor with the trehalase activity of the fat body of *Tenebrio molitor* (Insecta: Coleoptera).

An insulin-like hormone extracted from the midgut of the Coleopteran Tenebrio molitor *is able to activate the insect fat body trehalase* in vitro, *by acting either directly on enzyme extracts or following a previous incubation with isolated fat bodies. The mechanism exhibits a dose-dependent increase of the maximum velocity and a decrease of the dissociation constant. Neither bovine insulin, nor adipokinetic hormone, nor extracts of* corpora cardiaca *did show similar effects.*

INTRODUCTION. — Le tréhalose, α-α′ diglucoside (non réducteur), représente la fraction la plus importante des glucides circulants de l'hémolymphe des insectes. Il joue un rôle métabolique de premier plan dans le cycle du développement ([1], [2]) et constitue une source énergétique essentielle, en libérant du glucose sous l'action d'une tréhalase (α-α′ glucoside 1 glucohydrolase : EC-3-2-1-28), enzyme de la catégorie des α-glucosidases (EC-3-2-1-20). Il existe, en fait, plusieurs formes de tréhalases qui peuvent différer par leurs propriétés biochimiques et leurs localisations cellulaires ou extracellulaires, chacune jouant alors un rôle particulier dans le métabolisme du tréhalose de chaque tissu de l'insecte ([3], [4]). Les mécanismes moléculaires de leur régulation sont encore imparfaitement connus : toutefois, elles sont inductibles par leurs substrats [5] et rétro-inhibées par le glucose, produit de la réaction [6]. D'autre part, il a été montré, chez *Bombyx mori* ([7], [8]), que l'activité tréhalasique de l'ovaire est directement contrôlée par l'hormone de diapause; en outre, de récents travaux [9] ont fait apparaître une augmentation d'activité de l'enzyme dans l'hémolymphe et les muscles de la Blatte après injection d'octopamine *in vivo*. Il n'a pas été démontré, toutefois, si, dans ce dernier cas, il s'agissait ou non d'une interaction moléculaire directe.

Le présent travail a pour objet la mise en évidence d'une stimulation de l'activité tréhalasique du corps gras d'un insecte, *Tenebrio molitor*, par diverses préparations d'hormones d'origine endogène, ou étrangère, administrées *in vitro* soit directement sur des extraits enzymatiques, soit après incubation préalable avec des corps gras isolés.

MATÉRIEL ET METHODES. — Les larves de *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae) élevées sur son de blé additionné de farine et de pommes de terre ont été prélevées au dernier stade larvaire, lorsque leur poids corporel atteint environ 150 mg. Les corps gras ont été prélevés par micro-dissection rapide sous liquide physiologique d'Ephrussi et les tissus provenant de deux animaux (soit environ 50 mg de poids frais) ont été traités selon les deux protocoles suivants :

1° Les tréhalases ont été immédiatement extraites par broyage au micropotter dans 1 ml de tampon phosphate 75 mM, à pH 6,3 pendant 2 mn à 0°C suivi d'une centrifugation à 200 g pendant 10 mn à 4°C [9]. Le surnageant a été prélevé et conservé à −30°C en vue de l'étude de l'effet direct des extraits hormonaux sur l'activité enzymatique.

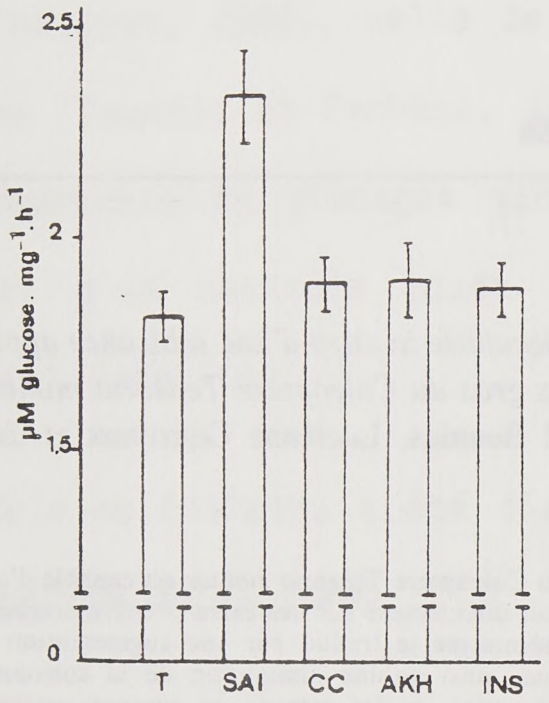


Fig. 1

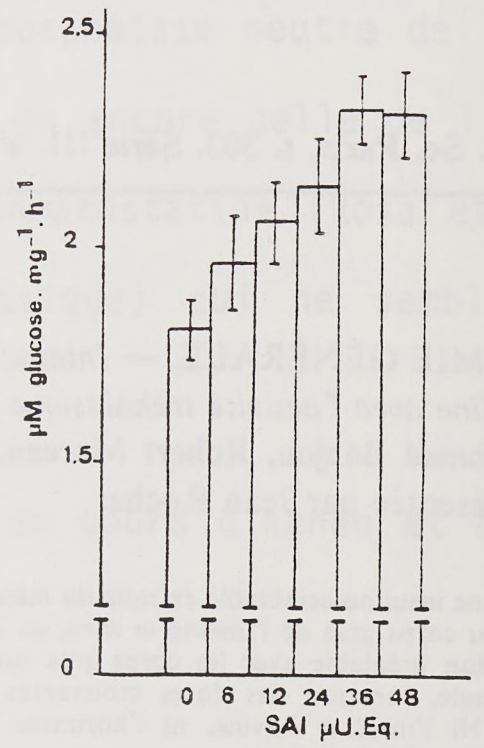


Fig. 2

Fig. 1. — Effets comparés de divers extraits hormonaux sur l'activité tréhalasique du corps gras de *Tenebrio* après incubation préalable. T = témoins; SAI = substance insulino-semblable (36 µU.Eq.); CC = corpora cardiaca (1 paire); AKH = hormone lipo-mobilisatrice de criquet (10 pM); INS = insuline bovine (50 µU). Les écarts-types ont été calculés à partir de N ≧ 12 mesures.

Fig. 1. — Comparative effects of various hormonal extracts on the trehalase activity of the fat body of Tenebrio *after previous incubation. T = controls; SAI = insulin-like substance (36 µU.Eq.); CC = corpora cardiaca (1 pair); AKH = adipokinetic hormone (10 pM); INS = bovine insulin (50 µU). S.D. calculated from N ≧ 12 determinations.*

Fig. 2. — Stimulation de l'activité tréhalasique du corps gras de *Tenebrio* après injection préalable avec des doses croissantes de substance analogue à l'insuline (SAI). Les écarts-types proviennent de N ≧ 9 mesures.

Fig. 2. — Stimulation of the trehalase activity of Tenebrio *fat body after previous incubation with increasing doses of insulin-like (SAI). S.D. calculated from N ≧ 9 determinations.*

2° Les corps gras isolés ont été préalablement incubés à 34°C seuls ou en présence des préparations hormonales dans 1 ml du milieu suivant dérivé de celui de Candy et coll. [10] : NaCl, 150 mM; KCl, 10 mM; $CaCl_2$, 4 mM; $MgCl_2$, 2 mM; HEPES, 2 %; albumine sérique bovine, 2 % (fraction V Sigma); pH = 7,0.

L'activité de la tréhalase extraite soit directement, soit après incubation préalable des corps gras, a été déterminée par la mesure de la quantité de glucose libérée par hydrolyse du tréhalose au moyen d'un auto-analyseur « Technicon » utilisant la détection spectrophotométrique à 420 nm de la réduction du ferricyanure de potassium, dans les conditions optimales de pH et de température de l'enzyme, préalablement estimées à pH = 6,3 et T = 40°C. Le temps d'incubation nécessaire est de 120 mn. Les paramètres cinétiques V_M (vitesse maximale) et K_m (constante de Michaelis-Menten) ont été déterminés d'après l'étude des variations

Explications de la Planche

Fig. 3. — Influence de la substance analogue à l'insuline (SAI) sur la cinétique d'activité tréhalasique du corps gras de *Tenebrio*. (●) = témoins; (▽) SAI (24 µU.Eq.). Représentations en coordonnées directes (*a*) et inversées (*b*). Les moyennes et les écarts-types ont été calculés à partir du nombre de mesures indiqué entre parenthèses en regard de chaque point.

Fig. 3. — Influence of the insulin-like substance (SAI) on the kinetic of trehalase activity of Tenebrio *fat body. (●) = controls; (▽) = SAI (36 µU.Eq.). Direct (a) and reciprocal (b) plots. Means and S.D. were calculated from the number of determinations given between parenthesis below each point.*

PLANCHE I/*PLATE I* AHMED BAHJOU

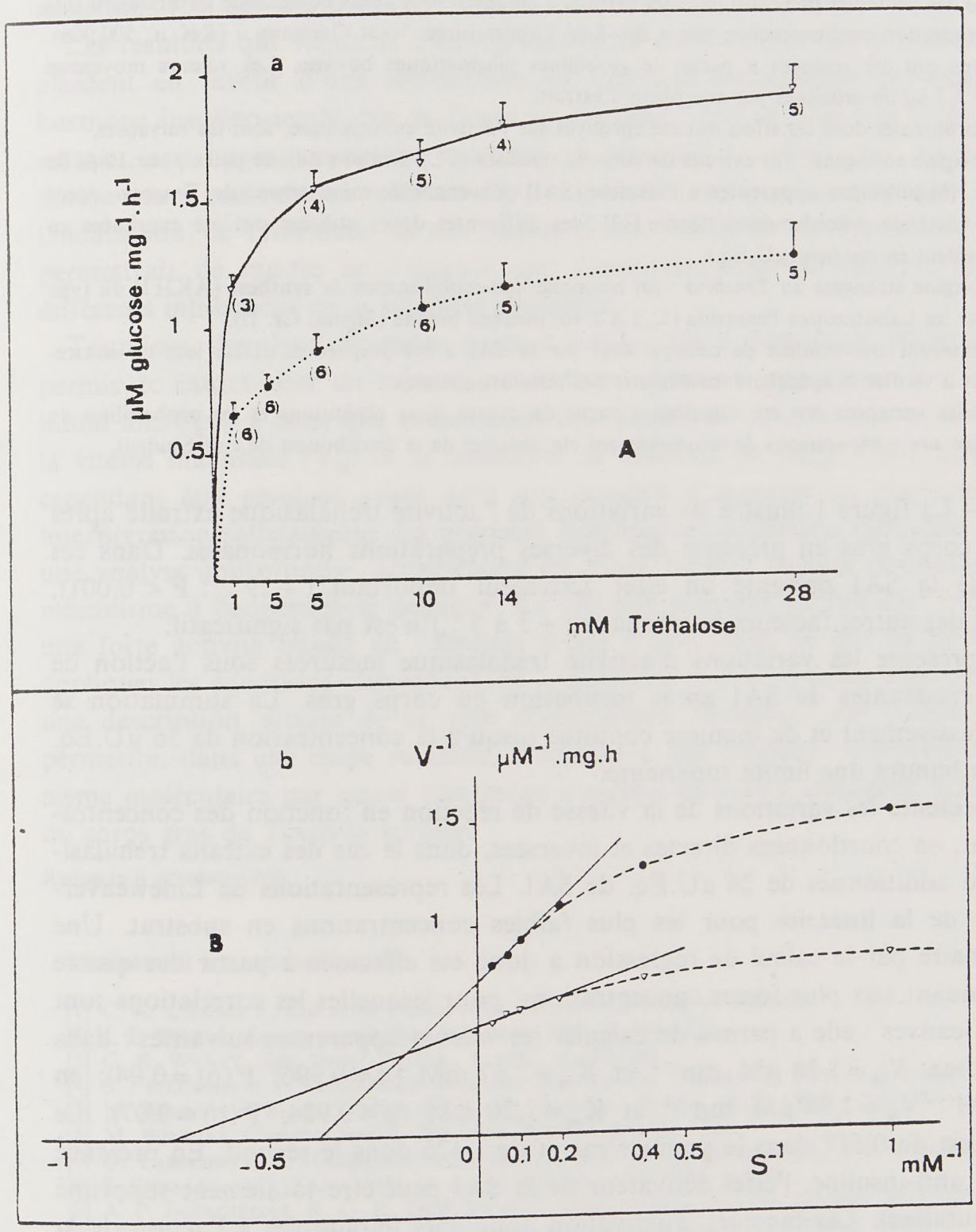


Fig. 3

de la vitesse de réaction en fonction des concentrations suivantes en substrat : 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 14,0; 28,0 mM. Le milieu réactionnel comprend 100 µl d'extrait enzymatique et 900 µl de substrat en solution dans du tampon acétate à pH 6,3. Dans le cas de la comparaison des effets de diverses substances hormonales, les activités enzymatiques ont été déterminées en présence de 28 mM de tréhalose, c'est-à-dire une concentration pour laquelle la vitesse de réaction est supérieure à 0,9 V_M.

La quantité totale des protéines présentes dans les extraits a été mesurée d'après la méthode de Bradford [11] au moyen de la préparation commercialisée par « Bio-Rad Laboratoires, West Germany » (Réf. n° 500.006). Les solutions étalons ont été réalisées à partir de globulines plasmatiques bovines. Les valeurs moyennes obtenues ont été de 4,3 µg de protéines par microlitre d'extrait.

Les substances hormonales dont les effets ont été éprouvés sur l'activité enzymatique, sont les suivantes.

1° Hormones d'origine endogène : (*a*) extraits de *corpora cardiaca* (CC) à raison de une paire pour 10 µl de solution d'Ephrussi. (*b*) substance apparentée à l'insuline (SAI) provenant de mésentérons de *Tenebrio*, après extraction selon la méthode précédemment décrite [12] : les différentes doses utilisées ont été exprimées en micro-unités d'équivalent en insuline (µU.Eq.).

2° Hormones d'origine étrangère au *Tenebrio* : (*a*) hormone lipo-mobilisatrice de synthèse (AKH I) du type *Locusta* préparée par les Laboratoires Peninsula (U.S.A.). (*b*) insuline bovine (Sigma, Gr. II).

Enfin, un immumsérum anti-insuline de cobaye, actif sur la SAI a été préparé et utilisé lors de contre-expériences destinées à vérifier la spécificité moléculaire des résultats obtenus.

Les moyennes et les variances ont été calculées à partir de quatre à six répétitions et les probabilités de signification associées aux comparaisons de moyennes ont été déduites de la distribution de *t* de Student.

RÉSULTATS. — La figure 1 illustre les variations de l'activité tréhalasique extraite après incubation des corps gras en présence des diverses préparations hormonales. Dans ces conditions, seule la SAI présente un effet activateur important ($+29\%$: $P < 0{,}001$), tandis que celui des autres facteurs hormonaux ($+3$ à 5%) n'est pas significatif.

La figure 2 présente les variations d'activité tréhalasique mesurées sous l'action de concentrations croissantes de SAI après incubation du corps gras. La stimulation se manifeste progressivement et de manière continue jusqu'à la concentration de 36 µU.Eq. où elle semble atteindre une limite supérieure.

La figure 3 présente les variations de la vitesse de réaction en fonction des concentrations en substrat, en coordonnées directes et inversées, dans le cas des extraits tréhalasiques témoins ou additionnés de 24 µU.Eq. de SAI. Les représentations de Lineweaver-Burk s'écartent de la linéarité pour les plus faibles concentrations en substrat. Une analyse préliminaire par le calcul de régression a donc été effectuée à partir des quatre points correspondant aux plus fortes concentrations, pour lesquelles les corrélations sont fortement significatives : elle a permis de calculer les valeurs apparentes suivantes : dans le cas des témoins, $V_M = 1{,}38\ \mu M.mn^{-1}$ et $K_m = 2{,}67$ mM ($\rho = 0{,}996$; $P(\rho) = 0{,}04$); en présence de SAI : $V_M = 1{,}94\ \mu M.mn^{-1}$ et $K_m = 1{,}36$ mM ($\rho = 0{,}924$; $P(\rho) = 0{,}07$). Le rapport V_M/K_m est de 0,517 dans le premier cas et de 1,426 dans le second. En présence d'immun-sérum anti-insuline, l'effet activateur de la SAI peut être totalement supprimé (données non publiées). Les facteurs d'activation apparents imputables à l'action de la SAI sont donc les suivants : $f(V_M) = 1{,}40$; $f^{-1}(K_M) = 1{,}96$; $f(V_M/K_M) = 2{,}76$.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Le corps gras des insectes a pour fonctions essentielles l'accumulation et la redistribution des réserves d'énergie glucidiques et lipidiques. Le tréhalose y est synthétisé à partir du glucose provenant soit de l'alimentation, soit de la glycogénolyse, soit encore de la gluconéogenèse. Il est alors libéré dans l'hémolymphe qui le transporte dans les tissus utilisateurs, en particulier les muscles, où des tréhalases le convertissent en glucose, directement utilisable comme source d'énergie. La présence d'une activité tréhalasique dans le corps gras lui-même, pourrait être liée d'une part à ses propres besoins énergétiques, et d'autre part, aux nécessités de régulation de la

concentration tissulaire en tréhalose. Celui-ci ([2], [5]), ainsi que d'autres substrats α-glucosidiques tels que le saccharose [13], peuvent provoquer *in vivo* un accroissement de l'activité tréhalasique par induction de la synthèse de nouvelles molécules d'enzyme, tandis que la nature des substrats paraît déterminer la constitution de complexes enzymatiques adaptatifs [14] par des processus d'associations moléculaires [15].

Les résultats qui viennent d'être présentés se différencient des précédents en ce qu'ils plaident en faveur d'une stimulation de l'activité tréhalasique pré-existante par une hormone insulino-semblable de l'insecte, capable d'agir *in vitro* soit directement sur des extraits, soit après incubation préalable en présence du corps gras. Le mécanisme, qui donne lieu à une relation « doses/effets », pourrait, certes, s'accompagner dans le cas de l'incubation de l'hormone et des tissus, d'une induction de synthèse *de novo*, ce que permettrait de mettre en évidence une expérimentation de contrôle faisant appel à différents inhibiteurs de la synthèse protéique.

Toutefois, l'analyse cinétique portant sur les cas d'interaction moléculaire directe a permis de caractériser un mécanisme correspondant, en apparence, à la levée d'un état initial analogue à celui que présenterait une inhibition de type mixte, affectant à la fois la vitesse maximale (V_M) et la constante de dissociation (K_m). Deux questions doivent cependant être résolues avant qu'il soit possible d'apporter au phénomène décrit une interprétation satisfaisante. La première concerne les propriétés cinétiques initiales, dont une analyse approfondie, actuellement en cours, montre qu'elles pourraient relever d'un mécanisme à coopérativité négative. La seconde provient du fait que l'enzyme présente une forte activité basale en l'absence totale d'activateur, ce qui ne permet pas de lui appliquer les équations classiques [16]. L'élaboration d'un système algébrique permettant une description précise de ce type d'interaction (Bounias, non publié), devrait nous permettre, dans une étape suivante, d'accéder à une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire par lequel l'hormone insulino-semblable endogène active la tréhalase du corps gras de *Tenebrio molitor*.

Reçue le 6 octobre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] C. K. CHANG, F. LIU et H. FENG, *Acta ent. sin.*, 13, 1964, p. 494-502.
[2] J. E. STEELE, *Energy metabolism in insects*, 1981, p. 101-133.
[3] G. R. WYATT, *Adv. Insect Physiol.*, 4, 1967, p. 287-360.
[4] S. FRIEDMAN et S. ALEXANDER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 42, 1971, p. 818-823.
[5] M. BOUNIAS et M. R. J. MORGAN, *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 B, 1985, p. 451-454.
[6] M. BOUNIAS, *Comptes rendus*, 285, série D, 1977, p. 1263-1266.
[7] O. YAMASHITA, K. HASEGAWA et M. SEKI, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18, 1972, p. 515-523.
[8] S. SHIMADA et O. YAMASHITA, *J. Comp. Physiol.*, 131, 1979, p. 133.
[9] A. P. JAHAGIRDAR, R. G. H. DOWNER et T. VISWANATHA, *Biochim. Biophys. Acta*, 801, 1984, p. 177-183.
[10] D. J. CANDY, L. T. HALL et I. M. SPENCER, *J. Insect Physiol.*, 22, 1976, p. 505-518.
[11] M. M. BRADFORD, *Analyt. Biochem.*, 72, 1976, p. 248-254.
[12] R. MOREAU, C. RAOELISON et B. SUTTER, *Comp. Biochem. Physiol.*, 69 A, 1981, p. 79-83.
[13] M. BOUNIAS, J. DEMONGEOT et M. R. J. MORGAN, *I.R.C.S. Med. Sc., Biochemistry*, 12, 1984, p. 546-547.
[14] M. BOUNIAS et M. R. J. MORGAN, *Internat. J. Biochem.*, 16, 1984, p. 939-941.
[15] M. BOUNIAS, *Comptes rendus*, 297, série III, 1983, p. 583-588.
[16] A. CORNISH-BOWDEN, *Fundamentals of enzyme kinetics*, Butterworths, 1979, p. 85-88.

Laboratoire de Physiologie animale, Métabolisme,
Université de Bordeaux-I, 33405 Talence Cedex
et Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A.-Avignon, 84140 Montfavet.

4 - POSSIBILITE D'ACTION D'UN SUBSTRAT SUR LA STRUCTURE ASSOCIATIVE D'UNE ENZYME.

Au cours de 1986, le point a été fait sur certaines idées ayant progressivement pris corps au cours des 10 années écoulées : il s'agissait, à l'origine, de tenter de comprendre par quelle sorte de mécanisme moléculaire les mêmes α-glucosidases de l'abeille pouvaient passer d'une cinétique à coopérativité négative à une coopérativité positive.

Les pages suivantes reproduisent la substance d'une conférence prononcée le 12 novembre 1986 à Belgrade.

COULD ENZYME BE CREATED BY SUBSTRATE ?
FROM HONEYBEES GLYCOSIDASE STUDIES, BACK TO THE ORIGIN OF LIFE ...

Prof. Dr. Michel BOUNIAS
Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, F84140 Montfavet (France)
University of Avignon, rue L. Pasteur, 84000 Avignon (France)

(Lecture presented for the ~~commemoration~~ celebration of the 50th anniversary of the faculty of Veterinary Medicine, at the University of Beograd, Yugoslavia)

As soon as a question is answered, two or preferably more new other ones raise up to the mind of scientists, requiring new ideas, new theories, new experiments, and new equipments in numerous cases.

One could not say how many thousands of publications have been dealing with enzyme adaptation, since the beginning of this century. But so much progress have been done that it can sometimes appear doubtful that anything completely new can still be discovered.

The induction of enzyme synthesis by substrates has been described for a long time : the pioneer's works of Desnuelle have clearly described the phenomena in the case of digestive enzymes as early as the years 60 (1). The release of pre-existing forms of enzymes (2)(3) as well as the activation from zymogens as precursors (4) are becoming more and more well known, too.

Besides these considerations on present-time enzymology, another question remains unanswered : when and how did enzymes appeared at the beginning of life ? Because the enzyme-synthesis is directed by nucleic acids, and nucleic acid synthesis necessitates the action of enzymes, this has been often compared to the question of deciding which of the hen and the egg appeared first.

Surprisingly, it may be from both theoretical and applied researches on honeybees enzymes that some ideas concerning this problem came to my mind several years ago..

1 - Former Researches on the regulation of honeybees glycemia.

About a dozen years ago, it was still doubtful that the glycemia of the honeybees was regulated (5) and this appeared to me a most interesting matter of researches as no criteria were available to appreciate the work and thus the productivity (hive products and pollination) of Bees.

One of the first striking results which appeared a few years later was that the honeybee haemolymph α-glucosidase was under control of a non michaelian feed back inhibition by the glucose released from trehalose (6).

The α-glucosidase activity was thus controlled <u>in vivo</u> by the glycemic components (7) and the occurrence of peptidergic (8) adrenergic (9)

and cAMP (10) control of the glycemia -now largely confirmed in various insect orders- gave an additional set of evidence that the honeybee glycemia was a regulated parameter, which was lastly shown to be strongly correlated to the productivity of honey (11).

2 - Cooperative properties of honeybees haemolymph α-glucosidases and the stoichiometric theory.

During these researches, it rapidly appeared that the cooperative properties of the enzyme varied from the negative to the positive form, according to developmental stages (12)(13). Using pharmacological inhibitors, evidence was then given that in the same haemolymph extracts, the enzyme species were able to switch from negative to positive cooperativity (14). This was the start point of the stoichiometric theory of enzyme cooperativity (15), in which the Hill coefficient is actually interpretated as a variable ratio of the number of substrate molecules to the number of enzyme protomer (associated in complexes) to which they bind. It is now ascertained that the haemolymph trehalase is a complex with specific and less specific molecular forms (16), and that other associating enzyme systems exhibit cooperative kinetics (17).

This could very likely account for some peculiarities of the induction of honeybees haemolymph trehalases and sucrases by the substrates trehalose and sucrose, in which it appeared that an important sucrase activity might be readily converted from a complex previously fitted for trehalose, independently of a further synthesis of enzyme molecules (18). Now, the kinetic parameters associated to the binding of either trehalose or sucrose to the enzyme gave confirmation to the idea that the association of enzyme protomers into functional complexes might be directed by the substrates themselves.

3 - Hill coefficients of the binding of trehalose and sucrose to the α-glucosidase complex of honeybees haemolymph.

The first characterization of trehalose and sucrose binding parameters were obtained using the technique of substrates competition. The principle, as illustrated in fig. 1, is based on the fact that a natural substrate (trehalose or sucrose) giving undetectable products by one given technique (spectrophotometry) compete with an artificial substrate (here : p.Nitrophenyl-α-D-glucoside) which allows a continuous recording of the reaction of spectrophotometric determination at λ=400nm of the released p.Nitro-phenol. Of course, the natural substrate kinetically behaves as an inhibitor despite he does act as a substrate !

Using the equation of CHOU (19) relating the control and inhibition velocities to the inhibitor concentrations and the Hill coefficient (n_i) of the inhibitor binding to the enzyme, (n_i) was determined for both sucrose (n_i=0.65) (20) and trehalose (n_i=1.43) (21).

The involved molecular interactions are depicted on fig. 2.

Then, the Hill coefficients (n_H or n) for trehalose and sucrose were directly calculated in a kinetic study of specific trehalase and

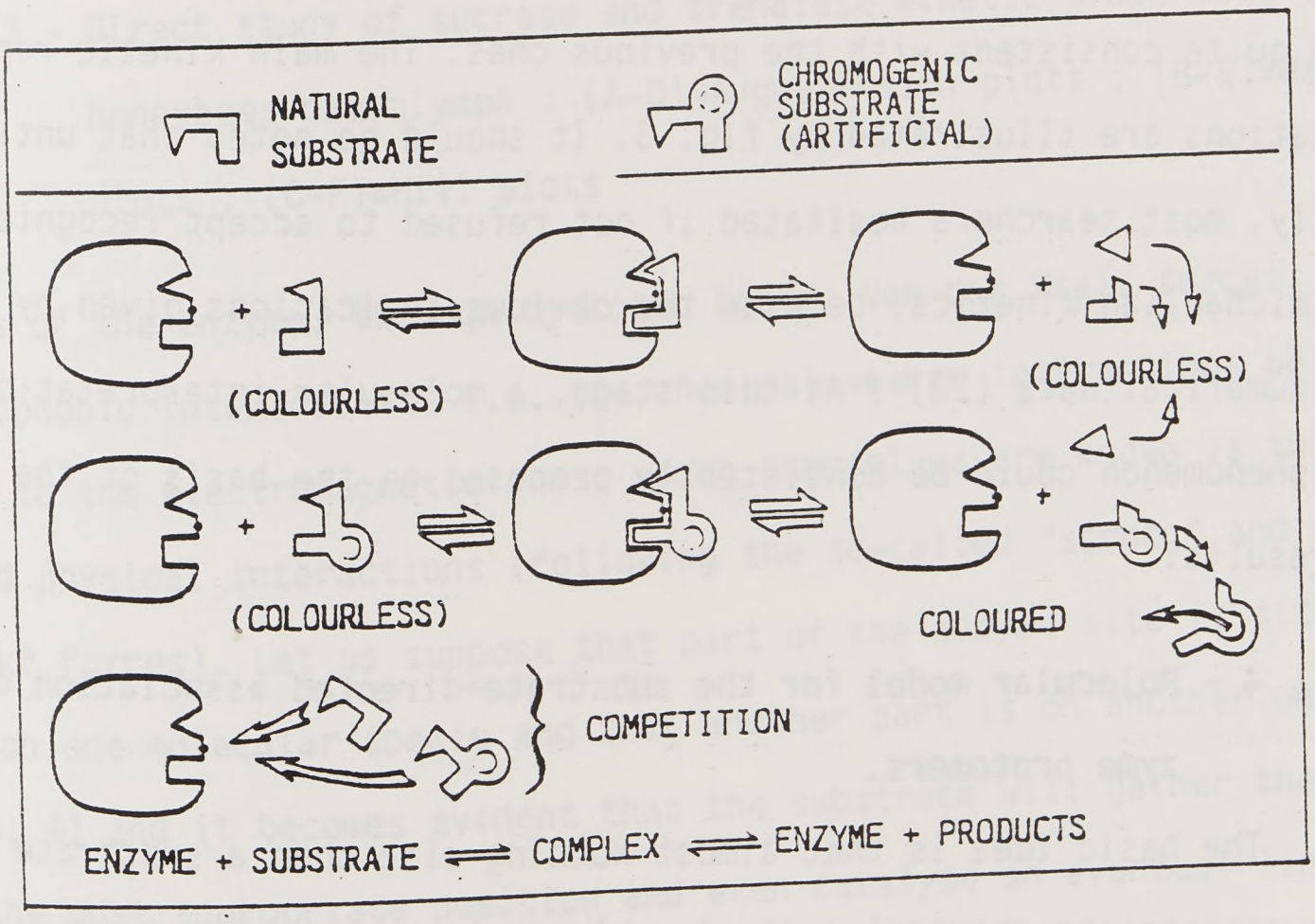


Fig. 1 - Principle of enzyme kinetic studies by competition of substrates

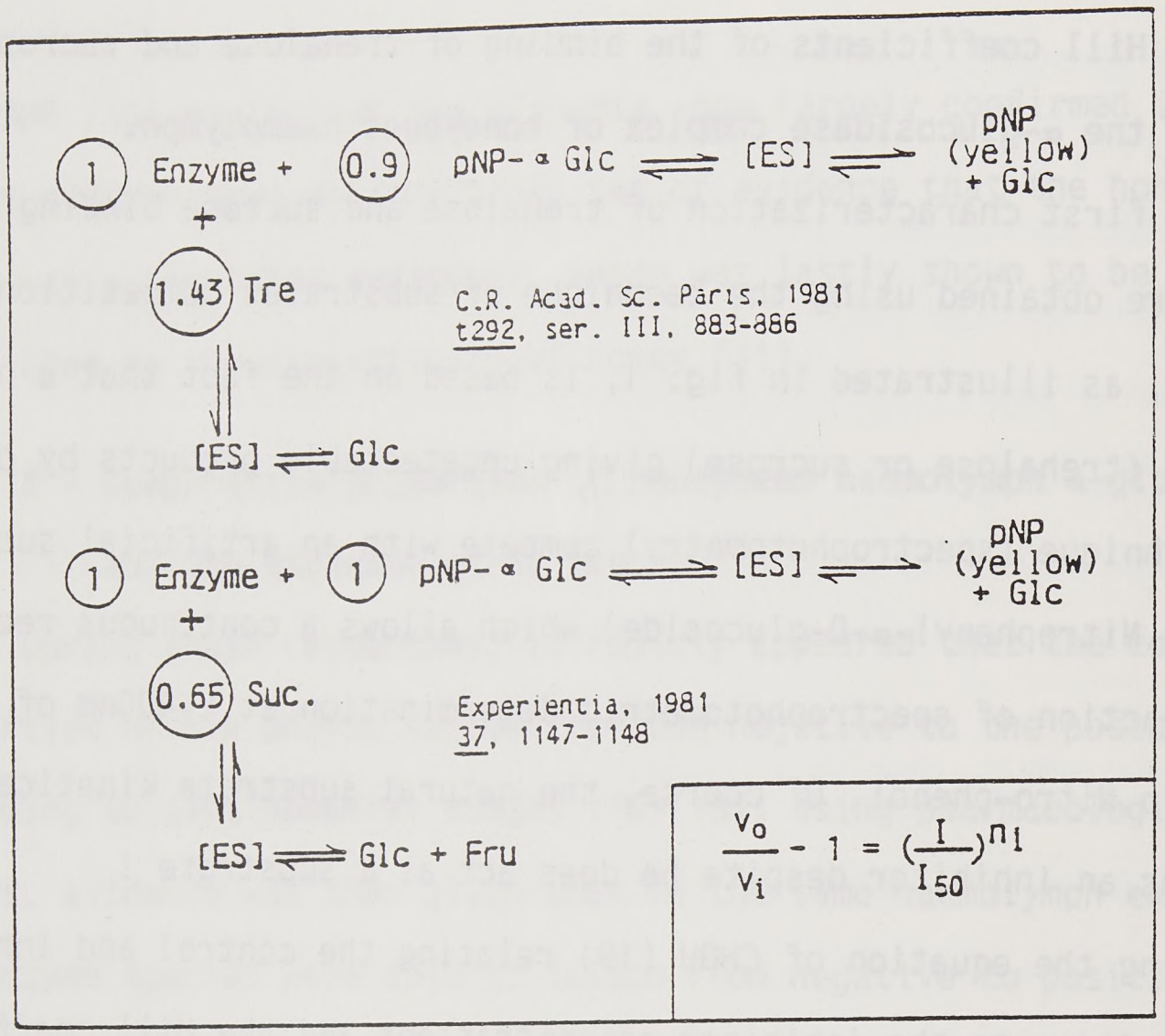


Fig. 2 - Hill coefficients of the binding of trehalose and sucrose to the trehalase and sucrase complexes of honeybees haemolymph

sucrase activities (22). The results (n=0.61 and n=1.39 respectively) were quite consistent with the previous ones. The main kinetic representations are illustrated by fig. 3. It should be noted that until recently, most searchers hesitated if not refused to accept recognizing non michaelian kinetics, despite the obvious indications given by their own numerical data (23) ! At this stage, a molecular interpretation of the phenomenon could be consistently proposed on the basis of the whole results.

4 - Molecular model for the substrate-directed association of enzyme protomers.

The basic idea is that almost nothing else than a substrate has more appropriate chemical radicals able to link with the corresponding

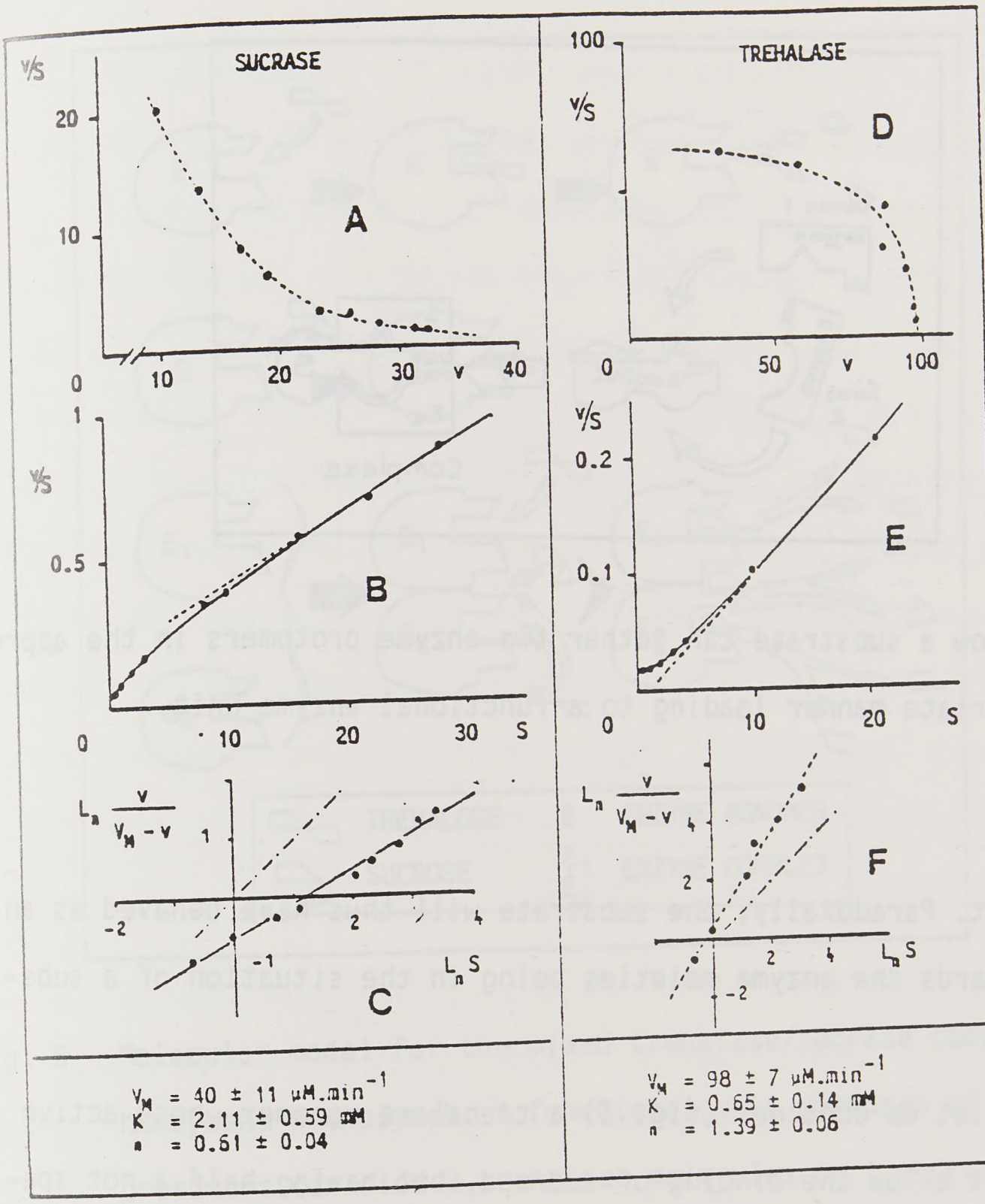


Fig. 3 - Direct study of sucrase and trehalase kinetic properties in honeybees haemolymph : (A-D)=Augustinsson plots ; (B-E)=Hanes plots ; (C-F)=Hill plots

sites of the enzyme, through hydrogen bonds, Van der Waals forces, hydrophobic interactions, i.e. the chemical weaker interactions belonging to the electromagnetic ones, which themselves are known as the third physical interactions (following the so-called "strong" and "weak" forces). Let us suppose that part of the enzyme site is situated on one molecular specie and that another part is on another one (fig. 4) and it becomes evident that the substrate will gather them in the most appropriate position and even catalyse an eventual linkage between these molecules which will then appear as one fonctional

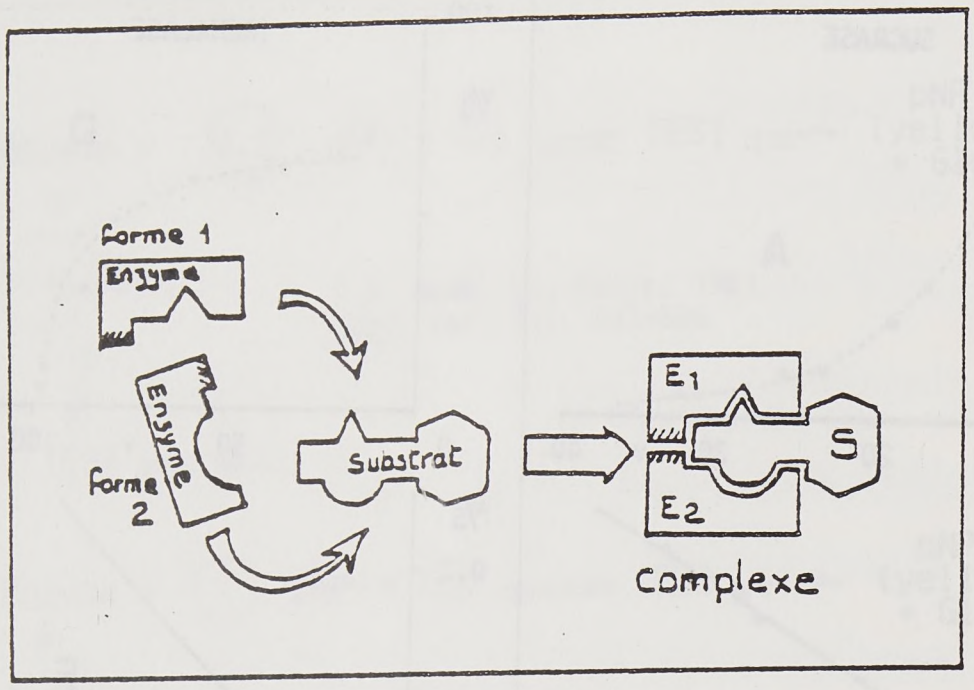


Fig. 4 - How a substrate can gather two enzyme protomers in the appropriate manner leading to a functional enzyme unit.

enzyme unit. Paradoxally, the substrate will thus have behaved as an enzyme towards the enzyme moieties being in the situation of a substrate !

Now let us consider (fig. 5) a trehalase monomer whose active site do not allow the binding of sucrose, but having half a not specific hydrolytic site.

Then the gathering (through sucrose mediation) of two subunits will give a complex with 3 catalytic sites, of which all are available for trehalose and one for sucrose. In this case (of course, neces-

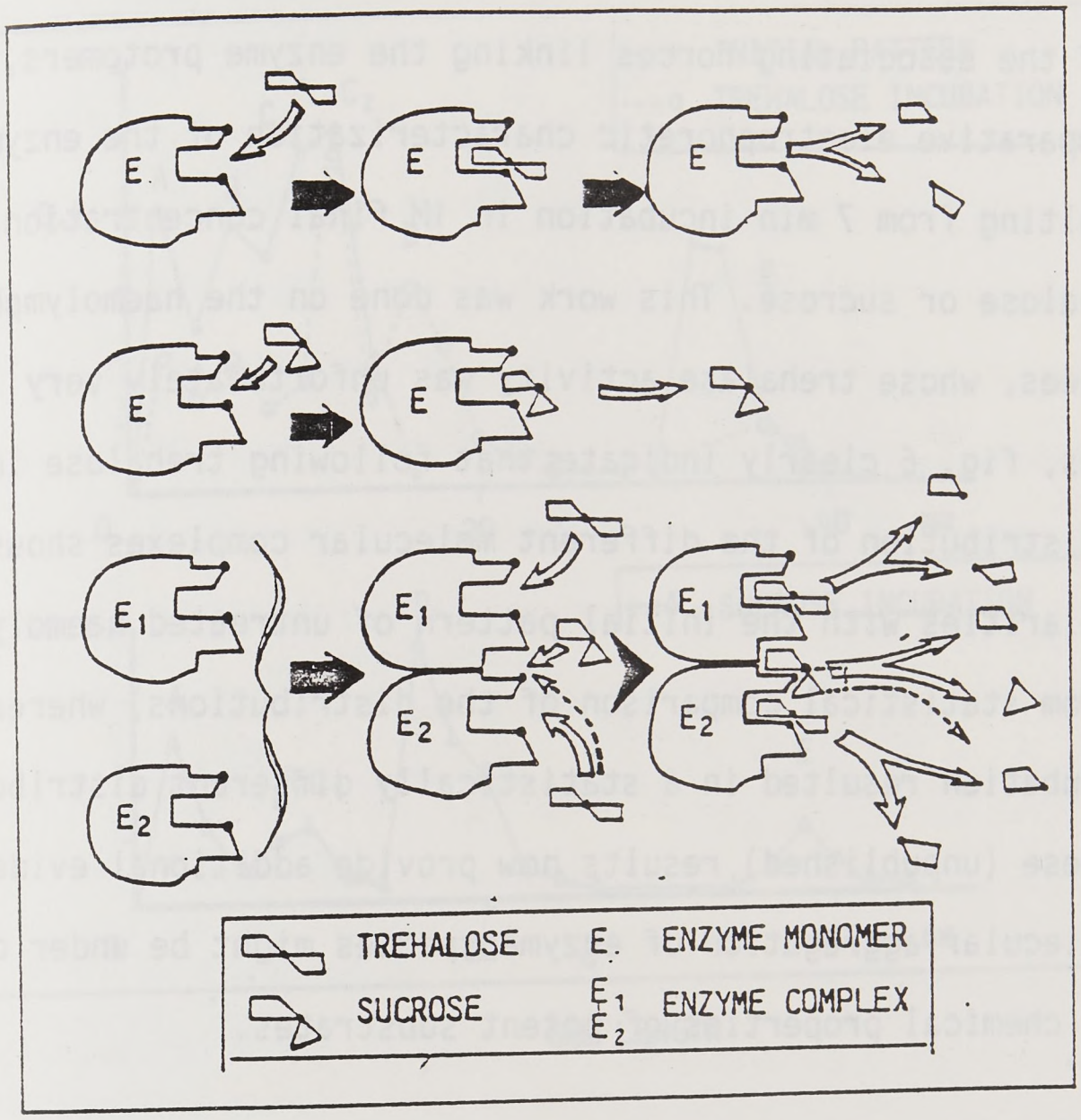


Fig. 5 - Molecular model for the mixed trehalase/sucrase complexes of honeybees haemolymph. A functional unit composed of 2 enzyme protomers can bind 3 trehalose molecules or 1 sucrose molecule

sarily simplified for clarity), the equivalents of the Hill coefficients according to the stoichiometric theory (15) will be : two enzyme species upon, respectively three trehalose molecules i.e. n=3/2 or n=1.5, and one sucrose molecule, i.e. n=1/2 or n=0.5. It cannot escape one's attention that these predicted numbers are very similar to the experimentally determined values.

This model thus actually accounted for the observed results, and let predict that in presence of a similar initial distribution of trehalase molecular species, the introduction of high concentrations of either trehalose or sucrose will result in a detectable rearrangement of the molecular associations. Despite the expectable

weakness of the associating forces linking the enzyme protomers, we tried a comparative electrophoretic characterization of the enzyme complexes resulting from 7 min incubation in 1M final concentration of either trehalose or sucrose. This work was done on the haemolymph of wintering bees, whose trehalase activity was unfortunately very low(*). Nevertheless, fig. 6 clearly indicates that following trehalose incubation, the distribution of the different molecular complexes shows strong similarities with the initial pattern of untreated haemolymph (P=0.008 from statistical comparison of the distributions) whereas sucrose incubation resulted in a statistically different distribution (P=0.5). These (unpublished) results now provide additional evidence that the molecular aggregation of enzyme species might be under control of the chemical properties of potent substrates.

5 - Did substrate created enzymes at the origin of life ?

It is now largely accepted, following the works of Professor Sydney Fox and his co-workers (24), that the polymerization of amino acids into "proteinoids" may have occurred on the primitive earth at different temperatures, including rather low ones (60°C).

(*) The author acknowledgesthe technical participation of Miss Sophie Coulomb as undergraduate fellow.

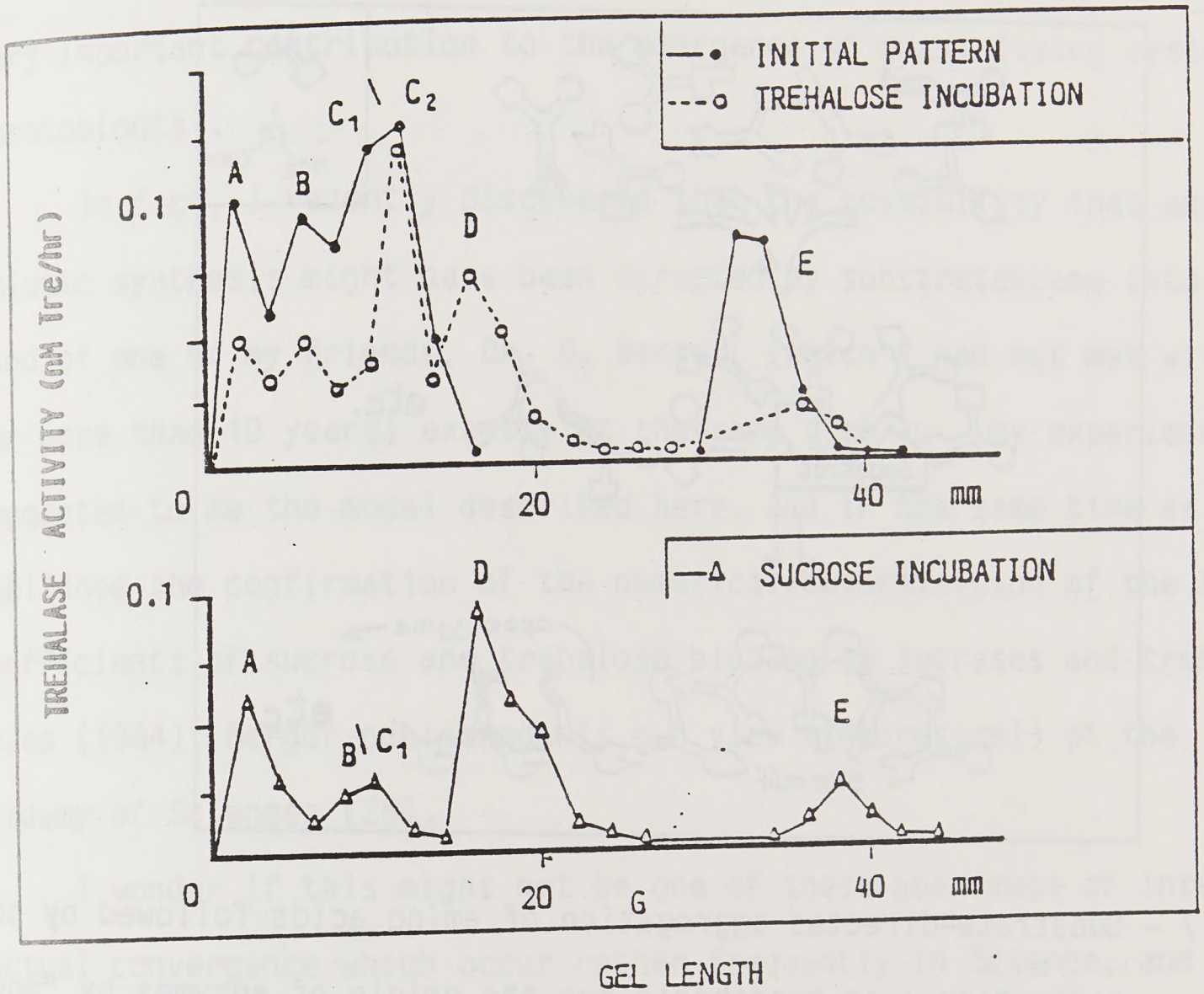


Fig. 6 - Influence of a previous incubation in concentrated trehalose or sucrose on the distribution of the molecular forms of the honey-bees haemolymph trehalase complex : separation on 7.5% polyacrylamide gel as in ref. (16)

Now, let us consider, as depicted on fig. 7, a set of amino acids binding to a substrate through their lateral chains interactions. Then, when polymerization occurs, a peptidic active site is created, while the rest of the molecule of proteinoid accounts for the apoproteic moiety of the enzyme. Fig. 8 shows how half-sites may have been created by the same way, since it is likely that a significant amount of products should have been present together with the enzyme because of the classical equilibrium laws of chemistry. Finally, peptidic sites and half sites may have occurred on the same proteinoids, leading to different kinds of associations able to bind various types of (new) substrates. It seems likely that such a mechanism may have played a

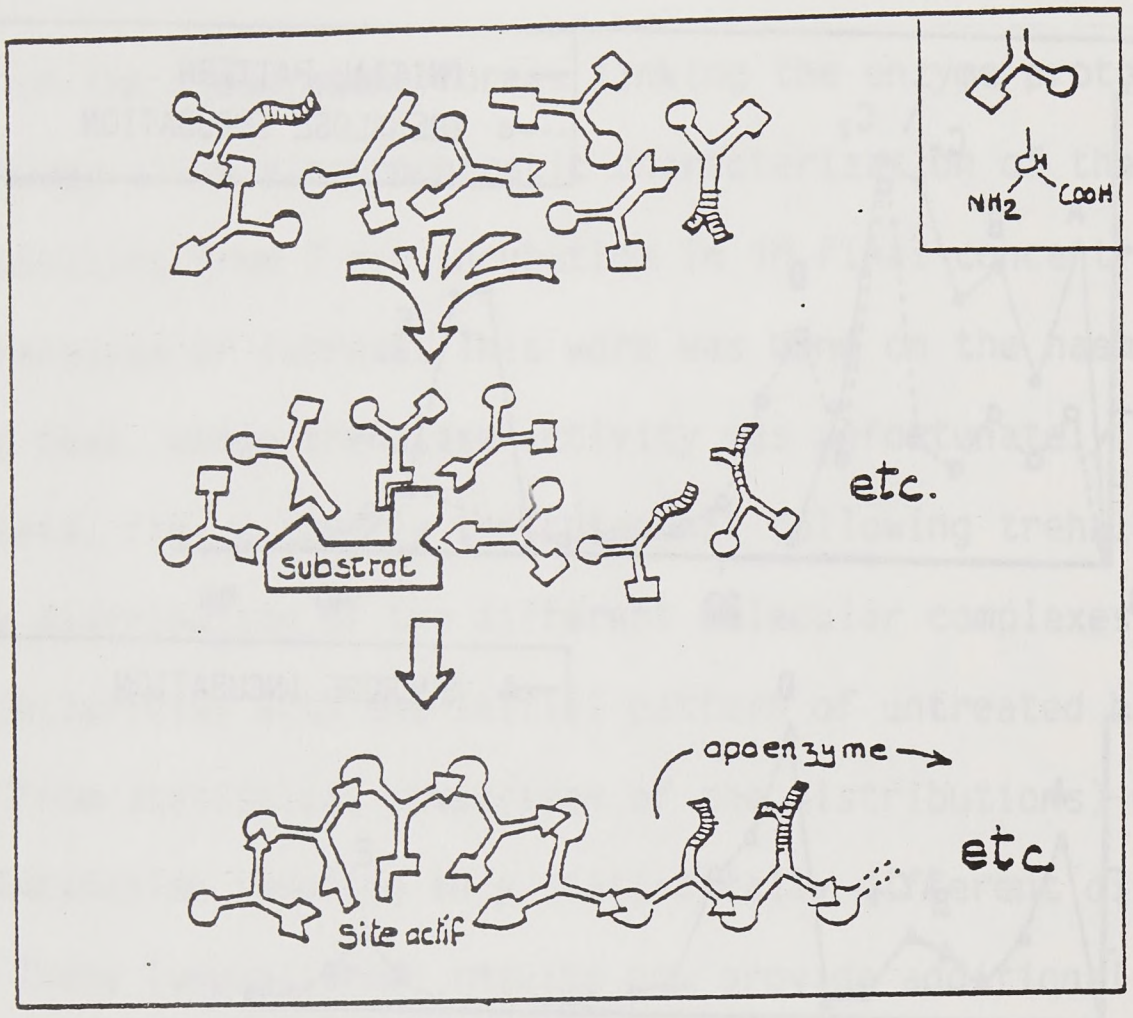


Fig. 7 - Substrate-directed aggregation of amino acids followed by polymerization : an hypothesis for the origin of enzymes by "moulding on substrates"

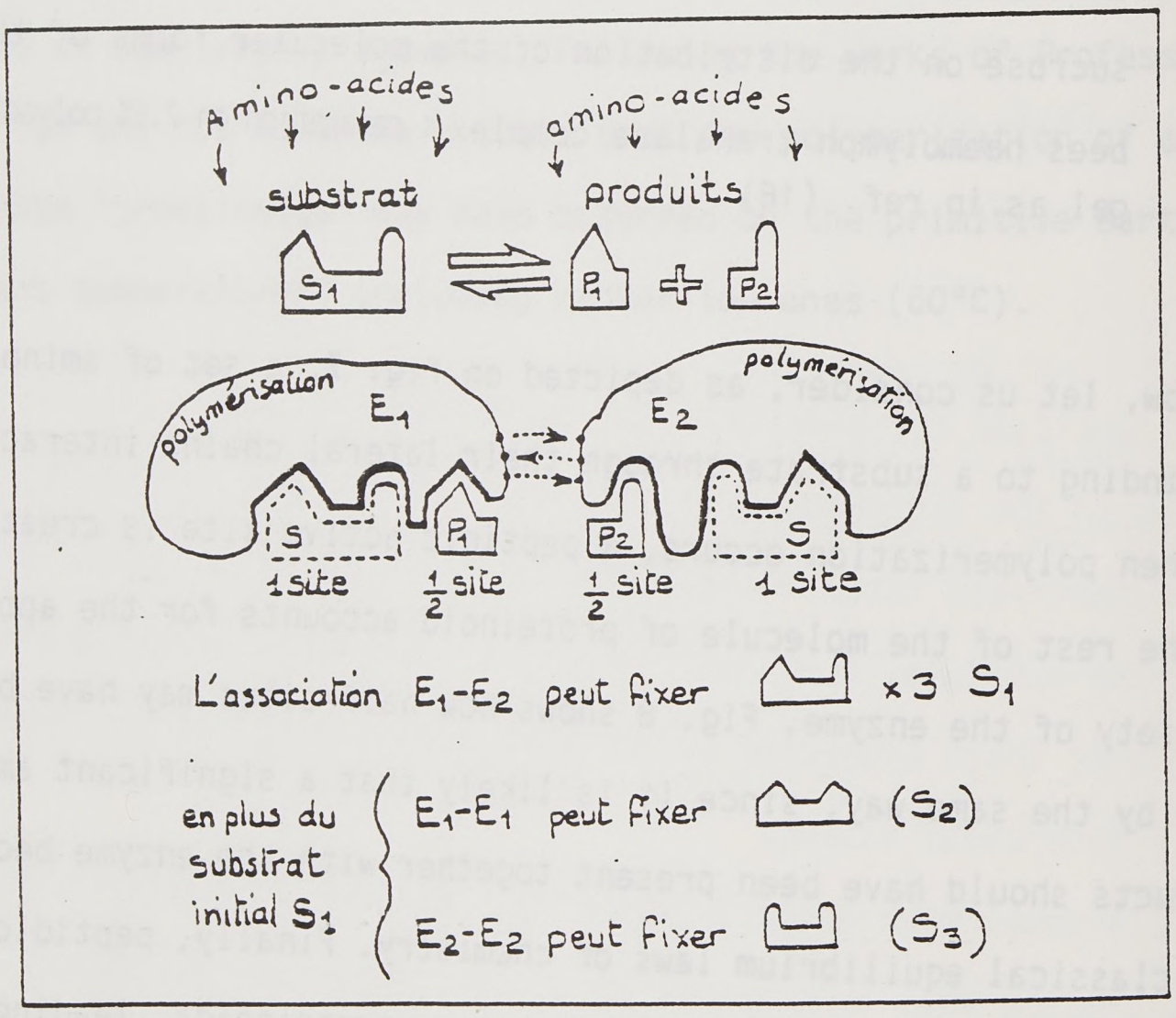


Fig. 8 - Substrate-and-products-directed abiotic synthesis of peptide chains : the aggregation of the resulting "moulded" molecules would give several forms of enzyme complexes able to treat various kinds of substrates, i.e. new substrates

very important contribution to the emergence of quasi-living systems (protobionts).

In fact, I recently discovered that the possibility that enzymes abiotic synthesis might have been directed by substratescame into the mind of one of my friends, Dr. G. Berger, (which I had not met with for more than 10 years) exactly at the same time as my experiments suggested to me the model described here. And in the same time as I published the confirmation of the numerical determination of the Hill coefficients of sucrose and trehalose binding to sucrases and trehalases (1984), Berger published his own view (theoretical) at the Academy of Sciences (25).

I wonder if this might not be one of these phenomena of intellectual convergence which occur rather frequently in Science, and that a philosoph would surely like to interpretate as belonging to one kind of collective unconsciousness or even to something like the morphogenetic fields (26) ...

6 - Concluding remark : the universality of the "moulding principle" as a basis for the construction of life.

The origin of the genetic code remains one of the most confusing questions to be solved (27)(28), and very closely connected with the problem of the egg and the hen. Now, a few years ago, Robert S. Root--Bernstein gave the first convincing evidence that abiotically produced peptidic chains might be self replicated by direct amino acid pairing through weak electromagnetic interactions (29)(30). But the most amazing in his observation is that the codon (3 nucleic bases) of one of the paired amino acids is very often the proper anticodon (3 complementary bases) of the other paired amino acid. Fig. 9 illustrate the example of the pair His-Val (linked by hydrophobic and Van der Waals interactions) and shows that surely the Universe found it preferable to dispose of two keysrather than a single one in order

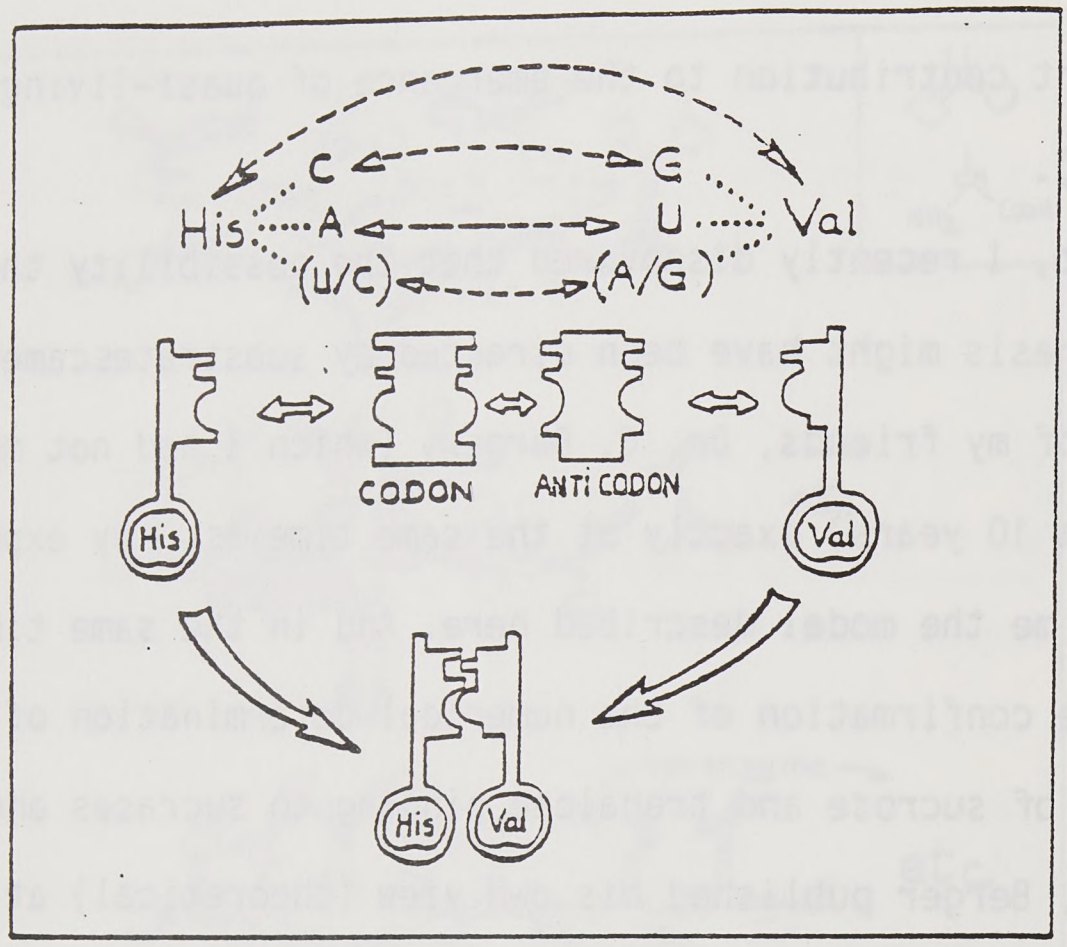


Fig. 9 - The consistency of direct amino acid pairing with the complementarity of their respective codons (after Root-Bernstein : see text). Another kind of "moulding" technique used by matter for the creation of life.

to open the process of life emergence : this is another striking example of the "moulding principle" which I believe to have opened most of doors to the very early processes in the building of primitive forms of life.

I whish now to emphasize the fact that such kinds of adaptative properties might be involved in present day events, and particularly the defense reaction mechanisms of living bodies against the toxicity of xenobiotics : this could be the case for pesticide action on honeybees which, together with biochemical traumatology of bees, is the aim of a collaboration now started for 6 years between the Department of Biology of the honoured Faculty of Veterinary Medicine of Belgrade, and the Laboratory of Biochemistry in Avignon : may I hope that this is just the beginning of a long-life and fruitful collaboration between scientific partners, at the very beginning, but rather between friends now.

REFERENCES

(1) P. Desnuelle, 1963, Rev. Franç. Et. Clin. et Biol., 8, 494-506

(2) N.R. Brandt, K.L. Hurlburt and R.E. Huber, 1979, Can. J. Biochem., 57, 1210-1215

(3) M. Iizuka, Y. Torii and T. Yamamoto, 1983, Agric. Biol. Chem., 47, 2767-2772

(4) B.H. Moreland and K.K. Sanyal, 1985, Biochem. Soc. Trans., 13, 1147-1148

(5) Y. Lensky, 1968, in : R. Chauvin, Traité de Biologie de l'Abeille, Masson (Paris), p. 481

(6) M. Bounias, 1977, C.R. Acad. Sc. Paris, 285D, 1263-1266

(7) M. Bounias, 1980, Comp. Biochem. Physiol., 66B, 335-341

(8) M. Bounias and H. Pacheco, 1979, C.R. Acad. Sc., 289D, 201-204

(9) M. Bounias and H. Pacheco, 1979, C.R. Acad. Sc., 289D, 33-36

(10) M. Bounias, 1986, C.R. Soc. Biol., 180, 77-88

(11) M. Bounias, 1981, J. Apic. Res., 20, 215-220

(12) M. Bounias, 1979, Comp. Biochem., 63B, 407-417

(13) M. Bounias, 1979, Experientia, 36, 157-158

(14) M. Bounias, 1982, Biochem. Pharmacol., 31, 2769-2775

(15) M. Bounias, 1983, C.R. Acad. Sc. Paris, 297-III, 583-588

(16) M. Bounias and M.R.J. Morgan, 1984, C.R. Soc. Biol., 178, 29-37

(17) B.I. Kurganov, 1983 and 1984, J. Theor. Biol., 103, 227-245 and 109, 59-70

(18) M. Bounias, 1983, C.R. Acad. Sc. Paris, 297-III, 583-588

(19) T.C. Chou, 1976, J. Theor. Biol., 59, 253-276

(20) M. Bounias and M.R.J. Morgan, 1981, Experientia, 37, 1147-1148

(21) M. Bounias and M.R.J. Morgan, 1981, C.R. Acad. Sc. Paris, 292-III, 883-886

(22) M. Bounias and M.R.J. Morgan, 1984, Internat. J. Biochem., 16, 939-941

(23) Y.A. Lefebvre and R.H. Huber, 1970, Arch. Biochem. Biophys., 140, 514-518

(24) S.W. Fox and K. Harada, 1958, Science (USA), 128, 1214

(25) G. Berger, 1984, C.R. Acad. Sc. Paris, 299-III, 333-338

(26) R. Sheldrake, 1981, A New Science of Life, French translation : 1984 (Ed. du Rocher, 231 pp).

(27) F.H.C. Crick, S. Brenner, A. Klug and G. Pieczenick, 1976,

(28) V. Bedian, 1984, Int. J. Quantum Chem., Quantum Biol. Symp., 11, 87-89

(29) R.S. Root-Bernstein, 1982, J. Theor. Biol., 94, 885-894 and 895-904

(30) R.S. Root-Bernstein, 1983, J. Theor. Biol., 100, 99-106

C - LOCALISATION DE L'ACIDE AZELAIQUE DANS LE CERVEAU DE L'ABEILLE

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 304, Série III, n° 3, 1987 79

PHYSIOLOGIE ANIMALE. — *Localisation chimique de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière.* Note de **Michel Bounias, Jean-Paul Jorand** et **Rémy Chauvin,** présentée par Jean Roche.

Une analyse chromatographique a permis la détection et le dosage dans des extraits alcooliques de cerveaux d'abeilles ouvrières, de l'acide azélaïque, facteur qui prolonge la survie des individus isolés.

ANIMAL PHYSIOLOGY. — Chemical localization in worker bees brain of azelaic acid, a factor responsible for the prolongation of isolated bees life span.

Azelaic acid, a factor which protracts the life span of isolated worker honeybees, was detected and quantitated by chromatographic techniques in alcool extracts of bees brains.

INTRODUCTION. — L'Abeille, insecte social, est extrêmement sensible à l'effet de groupe : dès 1944, Grassé et Chauvin [1] mettaient en évidence une diminution de la survie des individus isolés, tandis que Roth (1965) [2] observait chez ces derniers un accroissement du dégagement thermique paraissant correspondre à une stimulation métabolique vraisemblablement reliée à l'augmentation de la mortalité.

A partir d'épreuves de survie mises au point dès 1972, Chauvin ([3], [4]) a montré que des extraits de cire, ainsi que certaines traces que les ouvrières déposent en marchant sur les parois des récipients qui les contiennent, sont capables de retarder la mortalité des abeilles isolées. Il est intéressant de constater qu'une abeille morte est aussi efficace qu'une abeille vivante pour prolonger la durée de survie d'une isolée [5]. A partir de cette observation, des extraits actifs obtenus à partir de corps entiers ont reçu le nom de « survivones » [4]. Parallèlement, le corps entier d'une abeille morte ou la tête isolée d'une ouvrière réduisent l'intensité des échanges respiratoires de l'abeille isolée [6]. Le même résultat est obtenu en présence des cerveaux isolés de l'abeille, tandis que les glandes mandibulaires et hypopharyngiennes restent sans effet ou présentent une activité opposée [7].

Parmi les composants identifiés dans la « survivone », deux seulement, l'acide azélaïque (nonane dioïque 1-9) et l'acide pimélique (heptane dioïque 1-7) ([8], [9]) ont présenté une activité d'augmentation de la survie [6] et de diminution des échanges respiratoires des individus isolés ([6], [9]).

En revanche, dans la tarsone, qui ne recèle — au mieux — que de très faibles quantités d'acide azélaïque [10], la principale substance active s'est avérée être l'acide décanoïque : celui-ci, en effet, présente également la double propriété de prolonger la survie [8] et d'abaisser le taux des échanges respiratoires de l'abeille isolée [6]. En revanche, le cyclopentanol, actif sur la respiration, reste sans effet sur la survie [6].

Les acides azélaïque et pimélique ont été également identifiés dans des extraits provenant du lavage à l'éther du tégument d'abeilles groupées [6] : or, ces deux composés ont la propriété, lorsqu'on les dépose sur un tampon de coton, auprès des abeilles isolées, de prolonger sensiblement leur survie et d'abaisser le taux de leurs échanges respiratoires [6]. Seul, le cerveau isolé ayant présenté le même type d'effet, parmi les divers organes dont l'activité a été éprouvée, il paraissait donc légitime d'y rechercher la présence éventuelle de ces deux composants, ce qui a fait l'objet du présent travail.

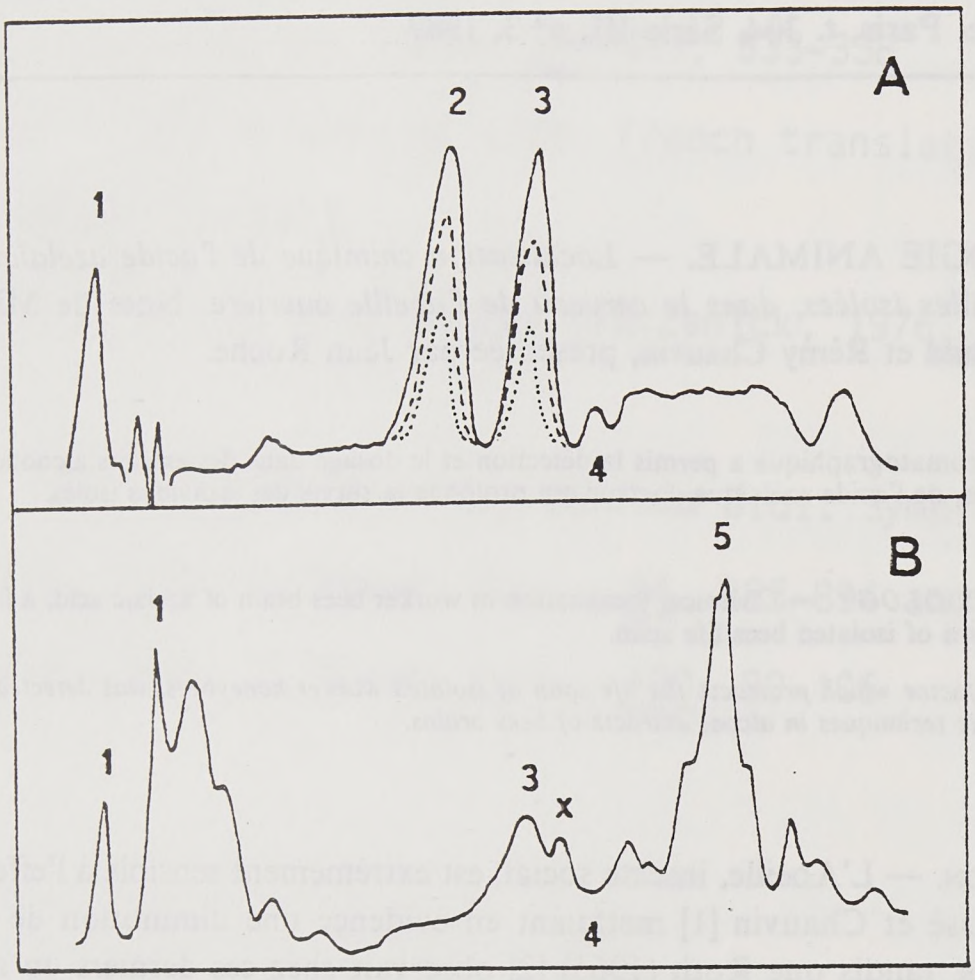


Fig. 1. — Enregistrements photométriques à 440 nm des chromatogrammes : A, Solution étalon; B, Extrait des cerveaux de 20 abeilles. 1, phospholipides; 2, acide pimélique; 3, acide azélaïque; 4, monoglycérides (non révélés); 5, acides gras à longues chaînes; *x*, *composé non identifié. Dans le cas des acides* azélaïque et pimélique, les enregistrements superposés correspondent à 12,5; 25 et 50 nmoles.

Fig. 1. — Photometric recording of the chromatograms at $\lambda = 440$ *nm. A, Standard solution; B, Extract of the brains of* 20 *bees; 1, phospholipids; 2, pimelic acid; 3, azlaic acid; 4, monoacyl-glycerol (not revealed); 5, long chain free fatty acids; x, unidentified compound. For azelaic and pimelic acids, the superimposed recordings of* 12.5, 25 *and* 50 *nmol are shown.*

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — 20 cerveaux ont été prélevés en octobre-novembre sur des abeilles d'une ruche. On les a débarrassés le mieux possible lors de la dissection, des fragments de glandes qui pouvaient s'y trouver attachés (des recherches antérieures ont montré que ni acide azélaïque, ni acide pimélique n'étaient décelables dans ces glandes). Les cerveaux ont été ensuite épuisés par l'alcool absolu bouillant, et l'extrait concentré.

Les extraits concentrés sont déposés sur plaques chromatographiques préfabriquées (Merck 5748) recouvertes de gel de silice, en présence d'une gamme étalon comportant un phospholipide (la sphyngomyéline) l'acide azélaïque, l'acide pimélique et la monolaurine aux concentrations de 50 mM. Les chromatogrammes ont été développés au moyen de l'éluant suivant : chloroforme-acétonitrile-méthanol-acide acétique (75-20-4-1 v/v) sur une hauteur de 8,5 cm. Les plaques sont ensuite imprégnées, par pulvérisation homogène, d'une solution de vert de bromocrésol (5 mg dans 12,5 ml d'éthanol et addition de soude 0,1 M jusqu'au virage).

Les acides gras libres apparaissent sous forme de taches jaunes sur fond bleu, le contraste étant maximal après 45 mn (± 15 mn) de chauffage à l'étuve à 80°C. Les monoglycérides apparaissent sous la forme de taches d'un bleu plus foncé que le reste de la plaque, tandis que les phospholipides comportent une zone centrale bleue auréolée de jaune. Les enregistrements photométriques sont effectués aux longueurs d'onde $\lambda_1 = 440$ nm et $\lambda_2 = 615$ nm qui correspondent respectivement aux maximum d'absorbance des acides par rapport au fond (pics positifs) et à l'inverse (pics négatifs) (Bounias et Jorand, non publié). Les courbes d'étalonnage n'étant pas linéaires, leur transformation en droites passant par l'origine a été effectuée en coordonnées semi-logarithmiques, après détermination du coefficient exponentiel x ([11], [12]) permettant d'obtenir une droite passant par l'origine, d'équation $S^x = p.C$ où S est la surface obtenue par l'intégration des pics, C la quantité de substance étalon et p un coefficient d'étalonnage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La figure 1 présente les enregistrements photométriques correspondant aux étalons et aux extraits. Ceux-ci contiennent une quantité importante de phospholipides ainsi que des acides gras et des monoglycérides.

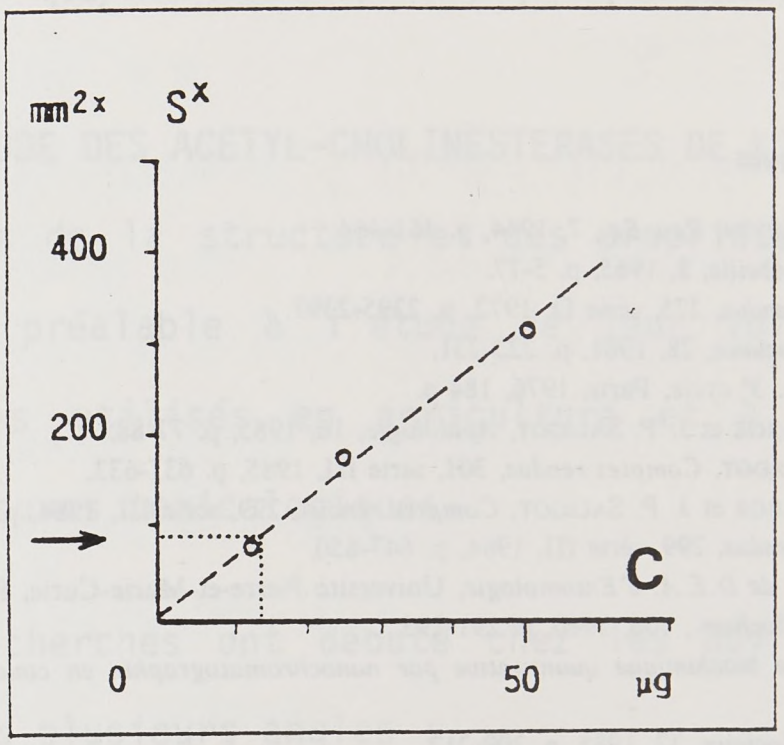


Fig. 2. — Étalonnage de l'acide azélaïque révélé par le vert de bromocrésol sur plaque de gel de silice et enregistré à $\lambda = 440$ nm. La droite $S^x = p.C$ est obtenue, ici, pour $x = 1{,}2$. Les écarts moyens des points étalons par rapport à la droite de régression ($\rho = 0{,}998$) donnent la précision relative de la méthode : $\pm 4{,}9\%$. La flèche indique les données relatives aux extraits de cerveaux d'abeilles.

Fig. 2. — Calibration of azelaic acid revealed by bromocresol green on silicagel plates and recorded at $\lambda = 440$ nm. The line $S^x = p.C$ is obtained, here, with $x = 1.2$. The means distances of standard points relatively to the regression curve ($\rho = 0.998$) give the relative error of the technique: $\pm 4.9\%$. Arrow indicates the data corresponding to the honeybees brains extracts.

Parmi les diacides à courte chaîne, seul l'acide azélaïque est présent en quantités dosables. Les deux mesures effectuées à partir de la totalité de l'extrait ont donné $C_{(az)} = 12{,}6 \pm 0{,}05$ nmoles par cerveau (*fig.* 2).

La présence de l'acide azélaïque dans le cerveau de l'abeille est donc confirmée, ce qui concorde avec les observations concernant l'activité de cet organe sur les échanges respiratoires de l'abeille isolée. Si l'on n'y trouve pas l'acide pimélique, c'est peut-être parce que les cerveaux sur l'extrait desquels a été opéré le dosage proviennent d'abeilles d'automne. Or, l'acide pimélique n'est actif sur les échanges (et pourrait n'être présent dans le cerveau) qu'au début du printemps [13].

Le contact direct entre deux abeilles paraît être une nécessité pour que se manifeste une atténuation de l'effet d'isolement [14] : il s'avère donc que si l'abeille isolée produit la survivone, elle ne puisse pas pour autant bénéficier de l'action de sa propre secrétion et doive donc la recevoir de l'extérieur. La question se pose donc de savoir par quel processus la survivone est émise vers l'extérieur, et une analogie n'a pas manqué d'être formulée avec le mode d'action de la phéromone royale, sachant que la présence d'une reine morte suffit à inhiber le développement ovarien des ouvrières [4]. La présence des acides azélaïque [13] et pimélique ([14], [15]) a été signalée, par certains auteurs, dans la gelée royale ([9], [15]), ce qui pouvait laisser supposer leur secrétion par des glandes céphaliques. Or, l'acide azélaïque, bien que décelé parfois dans les glandes mandibulaires de la reine ([16], [17]), n'y a pas toujours été retrouvé [18] et sa présence paraît encore douteuse dans celles des ouvrières [10].

De plus, ni des extraits acétoniques et éthérés de gelée royale, ni les glandes mandibulaires elles-mêmes [7], n'ont d'action sur l'abaissement du taux d'échanges respiratoires

de l'abeille isolée [9]. Elle ne prolonge pas non plus leur survie [19]. Ces différentes observations ne peuvent donc que renforcer l'importance que paraît maintenant jouer le cerveau comme siège vraisemblable des survivones. A l'appui de cette conclusion, il paraît utile de souligner que Sitbon avait formulé dès 1971 l'hypothèse que le déterminisme de l'effet de groupe pourrait être en relation avec l'intensité des neurosecrétions [20] : les abeilles d'hiver groupées par 30 contenaient davantage de cellules neurosecrétrices que les isolées, ce qu'Arnold confirma peu après sur des abeilles d'été [21].

Reçue le 8 décembre 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] P. P. GRASSE et R. CHAUVIN, *Rev. Sc.*, 7, 1944, p. 461-464.
[2] M. ROTH, *Annales de l'Abeille*, 8, 1965, p. 5-77.
[3] R. CHAUVIN, *Comptes rendus*, 275, série D, 1972, p. 2395-2397.
[4] R. CHAUVIN, *Insectes Sociaux*, 28, 1981, p. 223-231.
[5] G. ARNOLD, *Thèse Doct. 3e cycle*, Paris, 1976, 184 p.
[6] R. CHAUVIN, J. P. LAFARGE et J. P. SALIGOT, *Apidologie*, 16, 1985, p. 77-88.
[7] R. CHAUVIN et Y. GIRARDOT, *Comptes rendus*, 301, série III, 1985, p. 631-633.
[8] R. CHAUVIN, J. P. LAFARGE et J. P. SALIGOT, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 603-606.
[9] R. CHAUVIN, *Comptes rendus*, 299, série III, 1984, p. 647-650.
[10] J. P. JORAND, *Mémoire de D.E.A. d'Entomologie*, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris-VI, 1984, 20 p.
[11] M. BOUNIAS, *Analyt. Biochem.*, 106, 1980, p. 291-295.
[12] M. BOUNIAS, *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince*, Masson, Paris, 1982, 204 p.
[13] R. CHAUVIN, *Insectes Sociaux*, 32, 1985, p. 209-212.
[14] R. CHAUVIN, *Physiol. Comp. Oecol.*, 1, 1952, p. 1-7.
[15] G. LERCKER, P. CAPELLA, L. S. CONTE, F. RUINI et G. GIORDANI, *Lipids*, 16, 1981, p. 912-919.
[16] J. PAIN et M. BARBIER, *Insectes Sociaux*, 10, 1963, p. 129-142.
[17] J. PAIN, M. BARBIER, D. BOGDANOVSKY et LEDERER, *Comp. Biochem. Physiol.*, 6, 1962, p. 233-241.
[18] R. K. CALLOW, J. R. CHAPMAN et P. N. PATTON, *J. Apicult. Res.*, 3, 1964, p. 77-89.
[19] G. SITBON, *Apidologie*, 1, 1970, p. 423-438.
[20] G. SITBON, *Insectes Sociaux*, 18, 1971, p. 161-172.
[21] G. ARNOLD, *Comptes rendus*, 279, série D, 1974, p. 1539-1540.

Laboratoire de Biochimie, C.R. d'Avignon,
Domaine Saint-Paul, B.P. n° 91, 84140 Montfavet ;
Laboratoire de Sociologie animale,
Château d'Ivoy-le-Pré,
18380 *La Chapelle d'Angillon.*

Ce travail se poursuit avec la recherche des acides azélaïque et pimélique dans différents organes céphaliques de l'abeille à diverses périodes de l'année. Les résultats devraient contribuer à expliquer les variations observées dans le mode d'action biochimique de survivones. Les analyses ont été également étendues à la chromatographie liquide (HPLC) avec le concours de Mme Daurade.

Il apparaît d'ores et déjà comme un résultat très positif que l'adjonction des survivones à des abeilles isolées permettra, dans

le cadre de recherches toxicologiques, de considérer de tels individus comme normaux, ce qui n'aurait été le cas, sans cela, que de manière exceptionnelle et aléatoire.

D - ETUDE DES ACETYL-CHOLINESTERASES DE L'ABEILLE

L'étude de la structure et des propriétés des AChE d'abeilles constitue un préalable à l'étude de leur vulnérabilité à l'action des pesticides utilisés en agriculture et à la mise au point de nouvelles épreuves toxicologiques.

Les recherches ont débuté chez les ouvrières adultes et sont conduites sous plusieurs angles :

- influence du mode d'extraction : comparaison des formes moléculaires et des activités observées après extractions à haute ou basse force ionique, et en présence ou non de détergents, sur des préparations de synaptosomes.

- Influences de la concentration en substrat et en cations monovalents et divalents (des phénomènes biphasiques sont à prévoir dans divers cas)

- influence du pH

- influence de la température (où des anomalies de la droite d'Arrhénius ont été décrites dans d'autres organismes).

Les formes moléculaires sont séparées par ultra-centrifugation sur gradient de saccharose. Les fractions recueillies seront ultérieurement caractérisées de manière complémentaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide, et purifiées par diverses techniques de chromatographies d'affinités.

Chacune des formes principales devra faire l'objet d'une étude de cinétique complète (influence du substrat, du pH, de la tempéra-

ture, des cations). Les variations éventuellement observables tout au long de l'année dans des abeilles de même stade devront être vérifiées, de préférence dans le cerveau des adultes naissantes. (Les butineuses sont souvent hétérogènes).

Le cerveau étant susceptible d'une plus intense activité chez les adultes que dans le couvain (immobile et même enfermé par operculation dès le dernier stade larvaire), il serait intéressant de comparer les propriétés des AChE à divers stades du développement. Il serait utile, en particulier, de comparer les AChE des larves à celles éventuellement décelables dans l'hémolymphe et le reste du corps (thorax et abdomen) des adultes. De même, l'évolution des propriétés de l'enzyme serait intéressante à comparer au cours des phases successives de différenciation de la tête, entre le dernier stade larvaire (allongé) et les divers stades nymphaux. Il pourrait alors s'agir de formes présentant un caractère plus hydrophile que celles ancrées sur le smembranes synaptiques. Les relations bio-synthétiques entre les diverses formes constituent également un sujet de choix, certaines étant vraisemblablement des précurseurs et les formes "lourdes" étant constituées de l'association de protomères pouvant éventuellement revêtir, ailleurs, un autre type de fonction.

L'étude des interactions éventuelles (stimulation ou inhibition) avec d'autres molécules (solvants organiques susceptibles d'être employés comme solvants de pesticides, ou neuro-hormones elles-mêmes) pourrait ensuite être abordée.

Enfin, le mode d'action des pesticides appartenant aux principales classes, choisies par priorité en fonction de leur importance économique et de leurs risques potentiels vis-à-vis de l'abeille devrait être étudié par traitements in vitro et in vivo.

Parmi les développements annexes, il serait intéressant d'approfondir l'étude des formes non spécifiques de l'acétyle, et leur éventuelle implication dans certains mécanismes de résistance. L'étude comparée des AChE de l'abeille et de son parasite Varroa jacobsoni permettrait d'évaleur l'intérêt de la cible AChE dans le cadre de la lutte contre l'acarien, au moyen de molécules de type insecticide (Perizin, p. ex.) dont la spécificité pourrait donc être mise en doute. Grâce à une AIP de 150.000 F. s'ajoutant à l'infrastructure déjà en place, les moyens matériels les plus importants qui aient jamais été réunis en une seule fois au laboratoire ont été mis à la disposition de ce programme qui constitue le sujet de thèse de M. Belzunces, recruté en décembre 1984 et affecté au laboratoire au 1 janvier 1986.

II - BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE ET CRYPTO-TOXICOLOGIE

Il est extrêmement surprenant de lire dans certaines publications de toxicologie que la DL_2 peut être considérée comme "totalement inoffensive" (Barnavon 1985) et qu'une mortalité inférieure à 10% est "very little" (Haynes et Backer, 1985).

De là, l'ambigüité, entre autres, de certains indices tels que l'indice de sécurité ($IS = \frac{DL_2 \text{ en } \mu g/\text{individu}}{\text{dose d'emploi : Kg/ha}}$) dont on considère qu'inférieurs à 1 ils indiquent un danger pour l'abeille alors qu'égaux ou supérieurs à 1 ils signifient que le produit étudié est inoffensif (Barnavon, 1985).

Or, sur le seuil de la mortalité (DL_0), la toxicité doit avoir atteint un niveau extrêmement élevé et même critique. Les deux termes ne doivent en aucun cas être confondus et il convient de garder présent à l'esprit qu'une dose non létale dans certaines conditions

(repos, milieu favorable ...) peut devenir mortelle dans d'autres circonstances (effort, environnement défavorable, interactions d'autres facteurs toxiques ou pathologiques ...).

Les recherches du laboratoire se sont donc orientées vers la mise en évidence de symptômes toxicologiques susceptibles de se manifester avec diverses intensités à de faibles doses. Les travaux passés (BOUNIAS, 1972-1975 et 1983) sur les relations biochimiques fonctionnelles chez les végétaux ont servi de bases à certains aspects de ces programmes d'applications.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 303, Série III, n° 7, 1986 285

cr3$$$$143 05-08-86 09:04:30 CR3 143 049

PATHOLOGIE ANIMALE. — *Étude de l'action de la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le Diptère Aedes aegypti.* Note de **Michel Bounias, Bonaventure Nizeyimana** et **Constantin Vago,** présentée par Constantin Vago, Membre de l'Académie.

L'étude de l'action des oligodoses de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israëlensis* sur les larves du Diptère *Aedes aegypti* a permis de mettre en évidence certaines propriétés singulières au niveau des relations doses/effets basées sur les variations des pentes de régression des relations fonctionnelles observées sur les couples cystéine/sérine et acides gras/histidine, par opposition au couple acide gras/glucose qui donne lieu à une relation de forme classique. Il s'agit là de manifestations « crypto-toxicologiques » non létales par elles-mêmes, et n'entraînant pas de symptômes pathologiques, mais susceptibles de constituer l'amorce de processus d'« enchaînements pathogènes » conduisant, à terme, à l'apparition d'un syndrome secondaire létal.

ANIMAL PATHOLOGY. — A survey of the action of the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israëlensis* on biochemical functional relationships in *Aedes aegypti* (Diptera).

A study of the action of very low doses of the δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis israëlensis *on the larvae of* Aedes aegypti *(Diptera) gave evidence for peculiar properties of the dose/effect relations based on the variations of the regression slopes of functional relationships between the pairs cysteine/serine and fatty acids/histidine, by contrast with the pair fatty acids/glucose which exhibited a classical shaped relation. This indicates "crypto-toxicological" processes, not letal by themselves and without pathological symptoms, but able to initiate "pathogen-chaining" mechanisms leading, at the end, to a letal secondary syndrom.*

INTRODUCTION. — Depuis quelques années, une attention croissante est accordée, dans l'évaluation des effets pathogènes de germes toxigènes ou de substances toxiques, à l'action des oligo-infections ou des intoxications très faibles, surtout depuis que des mécanismes d'« enchaînements » de processus pathogènes, faisant suite à de telles étapes toxiques, ont été mis en évidence, et leur importance établie chez divers invertébrés ([1], [2]).

Cependant, pour la compréhension de tels mécanismes, se déroulant en grande partie sans aucun symptôme chez l'individu atteint, les approches habituelles par établissement de la DL_{50} ([3], [4], [5]), l'histologie ou l'analyse des teneurs en certaines substances, se sont montrées peu révélatrices de troubles physiopathologiques.

En approfondissant ce problème sur le modèle que constitue l'action des oligodoses d'une endotoxine de *Bacillus thuringiensis israëlensis* sur le Diptère *Aedes aegypti*, nous avons mis en évidence certaines modifications dans les inter-relations métaboliques entre les glucides et les aminoacides de l'hémolymphe ainsi que les lipides abdominaux de l'Insecte. Les variations des concentrations de ces composants ont été analysées sous l'action de doses croissantes de toxine, sur des larves ne présentant aucun signe extérieur d'intoxication. Certaines relations fonctionnelles entre représentants des trois classes biochimiques étudiées ont été mises en évidence chez les individus sains, et leurs modifications par l'action de la toxine ont pu être caractérisées en fonction des doses administrées [7].

Les résultats ont attiré notre attention sur certaines difficultés à définir des « doses efficaces » par simple extrapolation, et nous nous proposons, donc, dans la présente communication de montrer l'importance particulière de certains effets sublétaux à la lumière de quelques exemples illustrant des cas extrêmes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le germe dont l'action toxique a été étudiée, est la variété *israëlensis*, sérotype 14 [6], de la bactérie sporulée et cristallophore *Bacillus thuringiensis* Berliner, particulièrement active sur les Diptères. La matière toxique utilisée est sa δ-endotoxine sous forme de corps d'inclusion cristallins purifiés. Les larves d'*Aedes aegypti*, élevées comme précédemment décrit [7], ont été maintenues, à partir du

0249-6313/86/03030285 $2.00 © Académie des Sciences

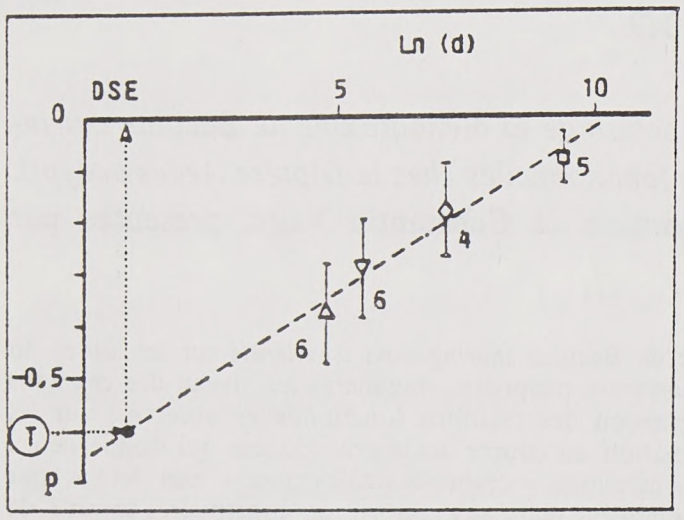


Fig. 1

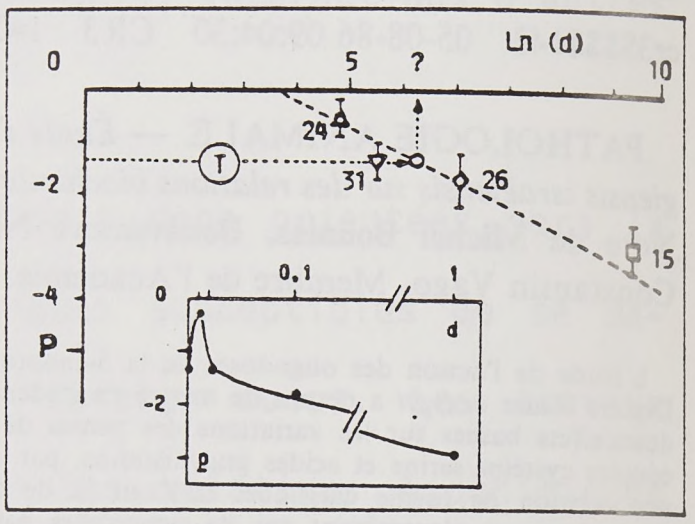


Fig. 2

Fig. 1. — Évolution de la pente (p) de la relation fonctionnelle entre les acides gras et le glucose d'*Aedes aegypti* en fonction des doses (d) de toxine exprimées en u. i. : ($\triangle$) = 120 u. i.; ($\triangledown$) = 240 u. i.; ($\diamond$) = 1 200 u. i.; ($\square$) = 12 000 u. i. Les valeurs observées chez les témoins sont désignées (T). Le nombre de mesures ayant conduit au calcul des pentes figure en regard de chaque point. Les pentes sont exprimées en nombres sans dimension (mM par mM).

Fig. 1. — Variations of the slope (p) of the functional relationship between Aedes aegypti *fatty acids and glucose according to toxin doses (d) expressed in i. u. Control values are designated by* (T). *The number of data used for the determination of slopes is indicated in front of each point.*

Fig. 2. — Évolution de la pente (p) de la relation entre la cystéine et la sérine de l'hémolymphe d'*Aedes aegypti* en fonction des doses (d) de toxine (u. i.). Mêmes symboles que sur la figure 1. Une représentation en coordonnées non transformées est indiquée en encart.

Fig. 2. — Variations of the slope (p) of the relationship between cystein and serin in Aedes aegypti *haemolymph according to toxin doses (d) (i. u.). Same symbols as on Figure 1. The inset graph is given in natural coordinates.*

début du quatrième stade, par lots de 25 individus en récipients de 200 ml, soit dans l'eau (témoins), soit dans des solutions contenant : 0,01/0,02/0,1/ et 1,0 mg/l de toxine titrant 12 000 unités internationales (u. i.) par milligramme, ce qui représente : 120/240/1 200/ et 12 000 u. i. par litre, respectivement. Les concentrations indiquées correspondent dans les conditions expérimentales décrites, à $DL \leqq 10$, $DL \leqq 50$, DL_{100} et $10 \times DL_{100}$ au-delà de 24 h. Les glucides et les acides aminés sont directement dosés à partir de l'hémolymphe brute, ponctionnée à l'aide de micro-seringues de 1 µl de capacité totale, puis les lipides sont extraits des abdomens isolés par le mélange chloroforme-méthanol (8-2 v/v). Les analyses quantitatives ont été effectuées par nanochromatographie en couche mince [8] et les chromatogrammes ont été enregistrés au moyen d'un spectrodensitomètre « CS920 ». Les analyses ont été effectuées avant traitements, puis au bout de 30 mn, 1 h, 1 h 30, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 36 h sur des larves ne présentant aucun symptôme extérieurement visible d'intoxication. Avec les deux doses supérieures, les prélèvements ont été limités respectivement à 8 et 2 h du fait de la mortalité plus élevée. Chaque mesure provient de l'analyse des extraits groupés de 20 larves. Les relations fonctionnelles retenues comme exemples concernent les couples suivants : acide gras/glucose; cystéine/sérine; acides gras/histidine.

Les probabilités (P) de signification des coefficients de corrélation (ρ) ont été déterminées à partir de l'équation de distribution de « t » de student. Les pentes de régression (nombres sans dimensions, ici) ont été désignées par b et leurs variances σ_b^2 ont été calculées au moyen de l'expression : $\sigma_b^2 = [(b/\rho)^2 - b^2]/(N-2)$ où N est le nombre de couples de mesures. Les intervalles de confiance ont été estimés au seuil $P = 0{,}05$ par $i = \pm t\,\sigma/\sqrt{N}$. Les relations doses/effets n'étant pas linéaires, les variations des pentes des relations ont été analysées en fonction du logarithme naturel (L_n) des doses (d) de toxine.

RÉSULTATS. — L'évolution, en fonction des doses, des pentes des relations fonctionnelles entre les acides gras et le glucose est illustrée par la figure 1. Avec les quatre doses de toxine, la corrélation est élevée : $\rho = +0{,}936$ ($P = 0{,}06$) et l'équation de régression linéaire : $p = 0{,}054\,L_n(d) - 0{,}58$ permet de calculer une dose théorique ayant les mêmes effets

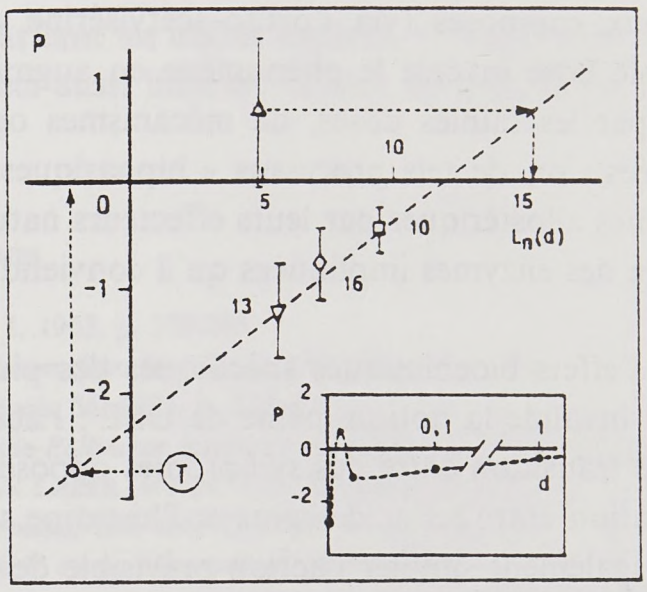


Fig. 3. — Évolution de la pente (ρ) de la relation entre les acides gras et l'histidine chez *Aedes aegypti* en fonction des doses (*d*) de toxine (u. i.). Mêmes notations que sur la figure 2.

Fig. 3. — Variations of the slope (ρ) *of the relation between* Aedes aegypti *fatty acids and histidin according to toxin doses* (*d*) (*i. u.*). *Same notations as on Figure* 2.

apparents que les témoins : pour une pente initiale $p_0 = -0{,}53$, cette dose s'établit à : $d_0 = 2{,}36$ u. i./l ou 0,2 µg/l.

La figure 2 illustre les variations de la pente de régression correspondant aux relations entre la cystéine et la sérine. La courbe est, ici, de type biphasique, avec une augmentation de la valeur des pentes sous l'action de la plus faible dose de toxine suivie d'un retour à la valeur initiale puis d'une diminution progressive avec les doses croissantes. L'ensemble des quatre doses permet encore d'établir une corrélation élevée : $\rho = -0{,}959$ ($P = 0{,}04$) dont l'équation de régression linéaire est : $p = -0{,}52\, L_n(d) + 1{,}89$. A la pente initiale $p_0 = -1{,}35$ mesurée chez les témoins, il correspond une dose théorique $d_0 = 492$ u. i./l soit 0,04 mg/l, qui se situe, donc, à l'intérieur des limites des doses réelles utilisées. Une relation de même nature a été également observée entre la cystéine et la sérine.

En ce qui concerne le couple acide gras/histidine (*fig.* 3), les pentes, négatives chez les témoins, tendent à augmenter en fonction croissante des trois plus fortes doses de toxine, selon une équation de la forme : $p = 0{,}2\, L_n(d) - 2{,}33$ ($\rho = 0{,}978$; $P = 0{,}13$). La pente mesurée chez les témoins : $p_0 = -2{,}78$ équivaudrait à celle produite par une dose $d_0 = 0{,}11$ u. i./l soit 9 ng/l, donc excessivement faible. Par contre, la dose 120 u. i. perturbe la relation entre acides gras et histidine dont la pente atteint même une valeur positive, $p = 0{,}65$ ($N = 13$) quoique de faible signification ($\pm 0{,}78$), dont le report sur la droite représentative de la relation doses/effets atteindrait une valeur correspondant à une dose théorique voisine de $3 . 10^6$ u. i./l soit environ 0,25 g/l.

Discussion et conclusions. — Dans les larves saines d'*Aedes aegypti*, au cours du quatrième stade, il apparaît une corrélation négative entre les acides gras et le glucose, dont l'équivalent a déjà été observé chez d'autres insectes ([9], [10]). Ce phénomène, qui témoigne de la complémentarité énergétique glucido-lipidique, est affecté de manière continue par des doses croissantes de toxine qui tendent à annuler la relation. Devant la linéarité du phénomène, il serait tentant de considérer la dose théorique d_0 correspondant à la pente p_0 observée chez les témoins, comme une « dose sans effet » (D.S.E.). Toutefois, la seconde relation étudiée, reliant la cystéine et la sérine, fait apparaître un phénomène différent : alors que les doses élevées de toxine accentuent la pente négative qui traduit

l'inter-convertibilité des deux composés (via l'ortho-acétylsérine et l'incorporation de l'anion soufre), la plus faible dose inverse le phénomène en augmentant la pente. Cela traduit la mise en œuvre, par les faibles doses, de mécanismes opposés à ceux qui se manifestent aux doses élevées : or, de tels processus « biphasiques » peuvent intervenir lors de la régulation d'enzymes allostériques par leurs effecteurs naturels ([11], [12]). C'est donc certainement au niveau des enzymes impliquées qu'il conviendrait de rechercher, ici l'origine du phénomène.

D'autre part, l'existence d'effets biochimiques spécifiques des plus faibles doses (inférieures à la DSE théorique) invalide la notion-même de DSE : l'absence d'effet apparaît alors, ici, comme une simple transition entre des symptômes opposés.

Enfin, l'exemple de la relation entre les acides gras et l'histidine suggère que de faibles doses de toxine pourraient également simuler l'action prévisible de très fortes doses, par le biais d'une certaine désorganisation des relations fonctionnelles.

Il convient d'observer, ici, que les concentrations de nombreux amino-acides sont fortement perturbées (le plus souvent dans le sens d'une accumulation) par la plus faible dose de toxine, la même observation s'appliquant aux acides gras et aux triglycérides [7]. Les effets provoqués par de faibles doses de toxines ne se limitent donc pas au seul cas des relations fonctionnelles présentées dans ce mémoire.

De tels phénomènes « crypto-toxicologiques » sont de nature à passer inaperçus en l'absence de recherches spécialement destinées à les mettre en évidence. Cette terminologie recouvre donc, ici, deux démarches associées : d'une part, la recherche, à l'aide de techniques biochimiques très sensibles, de symptômes non visibles par les méthodes courantes d'observation, et d'autre part, la recherche de ces mêmes symptômes dans des conditions d'action de faibles doses habituellement considérées comme dépourvues d'effets perceptibles. L'incidence propre de ces phénomènes, en l'absence d'autres facteurs, est vraisemblablement limitée et réversible. Toutefois, selon le contexte pathologique dans lequel ils se manifestent, leur importance peut revêtir une toute autre dimension. Nous avons pu constater, en effet, qu'un certain nombre de spécimens appartenant aux lots analysés, ont présenté des mortalités septicémiques tardives. Or, il a été montré, qu'une oligo infection par le *Bacillus thuringiensis alesti* quoique bénigne par elle-même, est néanmoins capable de préparer le terrain à la prolifération d'autres pathogènes, jusqu'à l'apparition d'un second syndrome aboutissant à la mort de l'hôte alors même que toutes traces du premier agent infectieux ont disparu [1]. Les résultats obtenus avec la toxine du *Bacillus thuringiensis israëlensis* conduisent donc à penser que certaines des manifestations biochimiques non létales apparues sous l'action de doses extrêmement faibles pourraient être à l'origine de processus d'« enchaînements pathologiques » tels qu'ils avaient été décrits dès 1956 [2] : selon les conditions environnementales, l'état pathologique des animaux pourrait alors évoluer au bout de délais variables dans une direction très différente de celle du syndrome primaire.

Il est intéressant d'observer que de telles conclusions convergent avec de récentes remises en question de la notion de « dose maximale tolérée », qu'il s'agisse du cas de l'action de toxines chimiques [13] ou de celle d'agents physiques [14].

L'intérêt des recherches sur de tels mécanismes d'enchaînements pathogènes et sur les manifestations crypto-toxicologiques qui apparaîssent comme étroitement liées à ceux-ci, sera appelé à croître au fur et à mesure que se resserreront les frontières entre deux nécessités difficiles à concilier : contrôler la prolifération des parasites ou des vecteurs de

maladies, tout en sauvegardant les autres espèces, en particulier les auxiliaires de l'équilibre des populations, et ceci aussi bien en milieux naturels qu'en agrocoenoses.

Reçue le 2 juin 1986.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] C. VAGO, *Insect Pathol.*, 1, 1963, p. 339-365.
[2] C. VAGO, *Ed. Spéciale Comm. Sér. Internat.*, 1956, 256 p.
[3] D. J. FINNEY, *Arch. Toxicol.*, 56, 1985, p. 215-218.
[4] R. W. SHUEL, in : *Pesticide-Pollinator interactions*, NRCC n° 18471, 1981, 194 p.
[5] M. VOLCKAERT et O. VAN LAERE, *Meded. Fac. Landbouwet, Rijksuniv. Gent.*, 49, 1984, p. 751-757.
[6] H. DEBARJAC, *Comptes rendus*, 286, série D, 1978, p. 797-800.
[7] B. NIZEYIMANA, *Thèse de 3e cycle*, Montpellier, 1985, 329 p.
[8] M. BOUNIAS, in : *L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince*, Masson, Paris, 1983, 205 p.
[9] R. W. MWANGI et G. J. GOLDSWORTHY, *J. Insect Physiol.*, 23, 1977, p. 1275-1280.
[10] M. BOUNIAS, R. MOREAU et L. GOURDOUX, *Comptes rendus*, 300, série III, 1985, p. 623-626.
[11] C. SANCHEZ et J. P. CHANGEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 1966, p. 705-713.
[12] M. BOUNIAS et H. PACHECO, *Comptes rendus*, 275, série D, 1972, p. 201-204.
[13] K. HASEMAN, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5, 1985, p. 66-78.
[14] M. ERRERA, *La Recherche*, 16, 1985, p. 959-968.

Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A.-Avignon, B.P. n° 91, 84140 *Montfavet*
et *Station de Recherches de Pathologie comparée, I.N.R.A./C.N.R.S./U.S.T.L.*, 30380 *Saint-Christol.*

C. R. Soc. Biol., 1986, *180*, 551-563.

Biochimie comparée

Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* I. Les glucides de l'hémolymphe

par Bonaventure Nizeyimana, Michel Bounias (*) et C. P. Vivares *

Laboratoire de Biochimie, INRA, C. R. d'Avignon, BP 91, 84140 Montfavet, France

* *Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie comparée et Station de Recherches de Pathologie comparée, INRA-CNRS U. A. n° 1184, 30380 Saint-Christol-lès-Alès*

(reçue le 10 juillet 1986).

Summary. — The glycemia of 4th instar larvae of *Aedes aegypti (Diptera Culicidae)* was determined over a 30 min to 36 hrs period following their immersion in water containing 0.00-0.01-0.02-0.1-1.0 mg per liter of a 12,000 I. U. per mg preparation of the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Seven major carbohydrate fractions were separated in the haemolymph, among which glycogen, trehalose and glucose were identified; the most concentrated of the 4 remaining unknown fractions, exhibits a similar chromatographic behavior but different chemical properties than glucuronic acid. The glycogen fraction shows two large amplitude peaks at 1 hr 30 and 6 hrs with 0.1 mg/l, whereas with the 2 lower doses (0.01 and 0.02 mg/l) a first drop from 30 min to 1 hr is followed by a peaking at 12 hrs. The haemolymph trehalose concentrations of intoxicated larvae increase relatively to controls 2 hrs after incubation with the lower dose; by contrast, they decrease with the 2 higher doses. The glucosemia increases in all cases, but more markedly with the higher dose as soon as 1 hr following the treatment.

A positive correlation was found over the whole treatment duration between the glucosemia and the trehalosemia of control larvae. The regression slope of this relationship decreases with increasing toxin doses and turns to negative values with 0.1 and 1.0 mg/l. These observations suggest the hypothesis that a uncontrolled increase of trehalase activity develops according to the increasing stages of intoxication. This clearly differenciates the effects of the *B. T. i* toxin from those of parasites, such as Fungi, Sporozoans or Nematodes in Mosquitoes.

(*) Auquel doivent être adressées les demandes de tires à part.

Résumé. — La glycémie de larves du 4e stade d'*Aedes aegypti (Diptera Culicidae)* a été mesurée de 30 mn à 36 h après leur immersion dans de l'eau contenant 0,01-0,02-0,1-1,0 mg/l d'une préparation de δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* titrant 12 000 U. I. par mg. L'hémolymphe contient 7 fractions glucidiques principales, parmi lesquelles le glycogène, le tréhalose et le glucose ont été identifiés; parmi les 4 composants inconnus, celui dont la teneur est la plus importante présente des caractéristiques chromatographiques voisines, mais des propriétés chimiques distinctes de celles de l'acide glucuronique. Le glycogène présente deux pics de forte ampiitude au bout de 1 h 30 et 6 h avec la dose 0,1 mg/l et un pic à 12 h précédé d'une chute de 30 mn à 1 h avec les doses les plus faibles (0,01 et 0,02 mg/l). La concentration en tréhalose augmente par rapport à celle des témoins après 2 h d'incubation avec la plus faible dose, mais elle diminue, au contraire, avec les deux doses les plus élevées. La glucosémie augmente dans tous les cas, principalement avec la dose la plus forte, et, dans ce cas, dès la première heure qui suit le traitement. Une corrélation positive est observée sur toute la durée de l'expérimentation, entre la glucosémie et la tréhalosémie des témoins : la pente de régression de cette relation diminue en fonction des doses croissantes de toxine et devient négative avec 0,1 et 1,0 mg/l. Ces observations suggèrent l'hypothèse qu'une augmentation non contrôlée de l'activité des tréhalases se développe en fonction des stades croissants de l'intoxication, ce qui différencie nettement l'action de la toxine du *B. T. i* de celle des parasites tels que Champignons, Sporozoaires ou Nématodes, chez les Moustiques.

La δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* est considérée par l'O. M. S. comme l'un des principaux moyens potentiels de lutte contre les moustiques, qu'ils appartiennent aux genres *Anopheles*, *Culex*, *Uranotaenia* ou *Aedes* (1, 2); mais, jusqu'à présent, très peu de travaux avaient été consacrés à l'étude biochimique du mode d'action de cette toxine chez ces Diptères. Or, depuis une dizaine d'années, plusieurs auteurs ont mis en évidence des modifications de la composition glucidique des larves de *Culex* et d'*Anopheles* sous l'action d'agents pathogènes tels que le Champignon *Lagenidium giganteum* (3, 4) ou le Sporozoaire *Plasmodium berghei* (5), le Nématode *Romanomermis culicivorax* (6). Chez *Aedes aegypti*, vecteur des virus de la dengue et de la fièvre jaune, des recherches histopathologiques ont montré une altération de la concentration en glucides du tissu adipeux des larves infectées par le Nématode *Reesimermis neilseni* (7) et, plus récemment, dans les muscles et le tissu adipeux des larves placées au contact de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis* (8).

Nous avons donc procédé à une étude comparée de l'action de cette toxine, employée à doses croissantes, sur les cinétiques de concentration en glucides et en amino-acides de l'hémolymphe, ainsi que des lipides abdominaux (9). Dans le présent travail, nous présentons les résultats numériques obtenus en ce qui concerne la glycémie.

Animaux et techniques. — Les œufs d'*Aedes aegypti* éclosent dans l'eau à 25° C oxygénée par un système de pompage et l'éclosion est déclenchée

par l'addition d'acide ascorbique à la concentration de 80 mg.l^{-1}, qui provoque un choc anoxique en diminuant soudainement la concentration de l'oxygène dissous dans l'eau. Lorsque les larves atteignent le début du deuxième stade, elles sont transférées dans des bacs maintenus à 28 ± 1° C contenant de l'eau à laquelle est ajouté, toutes les 48 heures, 1 mg d'aliments pour chiens par larve (20,5 % protéines; 7,5 % lipides; 7 % minéraux; 3,5 % cellulose; vitamines A, D3, E; glucides : stachyose, raffinose, maltose, saccharose, glucose, fructose, respectivement : 9,9; 3,7; 26,9; 41,5; 4,0; 43,4 nmoles par mg, selon l'analyse effectuée par les auteurs).

Les larves du IVe stade sont réparties par groupes de 25 dans des gobelets contenant 199 ml d'eau et 1 ml de suspension de toxine, de telle sorte que les concentrations finales soient : 0,00 (témoins); 0,01; 0,02; 0,1; 1 mg.l^{-1} de préparation titrant 12 000 unités toxiques internationales (U. I.) par mg. Les doses appliquées correspondent donc à 120; 240; 1 200 et 12 000 U. I. l^{-1}, respectivement.

Après des durées d'action comprises entre 30 mn et 36 h, des larves sont prélevées par échantillons de 20 individus. Après incision du siphon abdominal, l'hémolymphe est exprimée dans un tube de 2 mm de diamètre rempli d'heptane. Des volumes recueillis sont compris entre 4 et 8 µl pour 20 larves. Ils sont regroupés au fond des tubes par une centrifugation de 5 mn à 5 000 *g* qui élimine également les éléments figurés. Les glucides sont analysés par chromatographie « nanoquantitative » en couche mince d'après les techniques décrites ailleurs (10, 11, 12). L'hémolymphe est prélevée et déposée sur plaques de gel de silice (Merck 5348) au moyen de microseringues : une analyse de la glycémie peut être effectuée à partir de 0,1 à 0,2 µl.

Les prélèvements ont été opérés chez des larves ne présentant aucun symptôme visible d'intoxication, douées d'une mobilité spontanée et d'une réaction au toucher (à l'aide d'une aiguille inoxydable) normales par comparaison avec les témoins. Toutefois, des prélèvements complémentaires ont été également effectués à partir de larves présentant les signes caractéristiques de l'agonie (inertie totale et très faible réaction abdominale à l'excitation par une aiguille) en vue de caractériser comparativement les états extrêmes de l'intoxication.

Les probabilités associées aux comparaisons des moyennes et des variances sont calculées à partir des équations de distribution de « t » et de « F » respectivement.

Résultats. — A. GLYCÉMIE DES LARVES SAINES. — La figure 1A illustre un chromatogramme-type. Sept composants différents ont été séparés, parmi lesquels le tréhalose et le glucose ont été formellement identifiés par leurs mobilités dans divers solvants éluants ainsi que leur spectre d'absorption après révélation au moyen du réactif de Bounias (11). Le glycogène reste sur le point de dépôt, et le composé suivant présente une analogie avec le stachyose. Les trois fractions intermédiaires correspondent à des diholosides qui ont été dosés sur la courbe d'étalonnage du tréhalose.

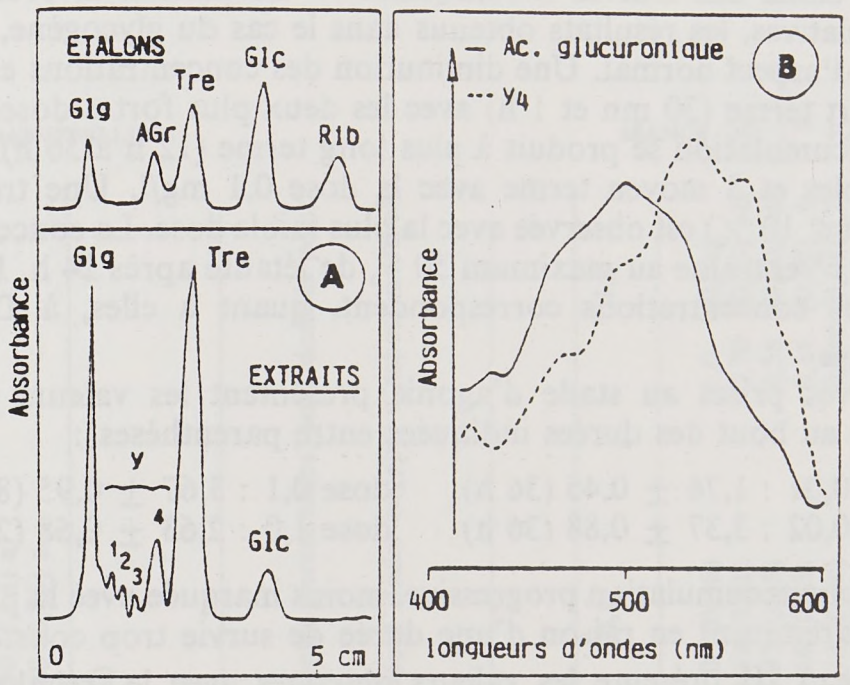


FIG. 1. — Séparation chromatographique et identification des glucides de l'hémolymphe d'*Aedes aegypti* : A. — Chromatogrammes d'étalons et d'extraits (Glg = glycogène; AGr = acide glucuronique; Tre = tréhalose; Glc = glucose; Rib = ribose; y_1 à y_4 : non identifiés). B. — Comparaison des spectres d'absorption respectifs de l'acide glucuronique et du composant y_4 révélés au chlorhydrate de naphtyl-éthylène diamine (11).

Aucune de ces fractions ne paraît correspondre à l'acide glucuronique, signalé comme prédominant dans les larves d'*Anopheles stephensi* (5) : la plus proche par sa mobilité et quantitativement la plus importante : y_4, en diffère très largement par son spectre après révélation, comme l'indique la figure 1B.

Le tableau I présente l'évolution des valeurs moyennes de la glycémie des larves saines au cours des 36 heures qui suivent le début du 4e stade.

TABLEAU I. — Concentration des principaux glucides de l'hémolymphe des larves saines du IVe stade d'*Aedes aegypti*.

Composants	Durée d'élevage				
	0-8 h	12 h	24 h	36 h	cv
Glycogène	2,8	1,3	1,74	0,80	0,26
Tréhalose	17,1	37,0	45,5	38,0	0,39
Glucose	2,9	8,1	7,5	1,7	0,45
y_4	0,6	1,8	1,3	2,7	0,96

Les moyennes indiquées en mM sont calculées à partir de 12 mesures dans le cas des échantillons prélevés de 0 à 8 h et 2 mesures dans les autres cas.

B. GLYCÉMIE DES LARVES INTOXIQUÉES. — Le tableau II présente, en valeurs relatives, les résultats obtenus dans le cas du glycogène, à partir de larves d'aspect normal. Une diminution des concentrations est observée à court terme (30 mn et 1 h) avec les deux plus fortes doses, tandis qu'une accumulation se produit à plus long terme (12 h à 36 h) avec les doses faibles et à moyen terme avec la dose 0,1 mg/l. Une très faible mortalité ($\leqslant 10\ \%$) est observée avec la plus faible dose. La concentration 0,02 $mg.l^{-1}$ entraîne au maximum 50 % de létalité après 24 h. Les deux plus fortes concentrations correspondent, quant à elles, à DL_{100} et $10 \times DL_{100}$.

Les larves prises au stade d'agonie présentent les valeurs relatives suivantes, au bout des durées indiquées entre parenthèses :

dose 0,01 : 1,76 ± 0,45 (36 h) dose 0,1 : 3,67 ± 0,95 (8 h)
dose 0,02 : 3,37 ± 0,88 (36 h) dose 1,0 : 2,63 ± 0,68 (2 h).

Il y a donc accumulation progressive, moins marquée avec la plus forte dose, apparemment en raison d'une durée de survie trop courte.

Le tableau III présente les valeurs obtenues avec le tréhalose. Une augmentation significative est observée après 2 h et 12 h d'exposition à la plus faible dose, tandis que les doses plus élevées entraînent une diminution de la tréhalosémie particulièrement rapide et importante avec 1 $mg.l^{-1}$. Chez les larves parvenues à l'agonie, la tréhalosémie est systématiquement réduite, comme l'indiquent les valeurs suivantes, exprimées en unités relatives C/C_0 :

dose 0,01 : 0,48 ± 0,17 (36 h) dose 0,1 : 0,26 ± 0,09 (8 h),
dose 0,02 : 0,12 ± 0,04 (36 h) dose 1,0 : 0,40 ± 0,14 (2 h).

Le tableau IV indique les valeurs de la glucosémie observée au cours des divers traitements. Il est surprenant d'observer, pour le glucose, une variabilité très supérieure à celle des autres composants biochimiques (9). La glucosémie subit une augmentation d'autant plus précoce et intense que les larves sont exposées à des doses plus élevées de toxine. Il est intéressant de constater qu'avec les deux plus faibles concentrations, le niveau élevé atteint après 12 h est suivi d'un retour à la normale à 24 h puis d'une nouvelle augmentation au bout de 36 h.

Parvenues au stade d'agonie, les larves présentent, dans chaque cas, une très forte glucosémie (expression en unités relatives, C/C_0) :

dose 0,01 : 6,88 ± 2,8 (26 h) dose 0,1 : 10,6 ± 2,7 (8 h),
dose 0,02 : 3,58 ± 0,93 (36 h) dose 1,0 : 4,5 ± 1,17 (2 h).

Le tableau V présente les variations des concentrations du composant, inconnu le plus abondant (y_4). Les résultats ne montrent que peu de variations par rapport aux témoins : seule la plus forte dose laisse apparaître une diminution significative des valeurs mesurées. En revanche, les larves à l'agonie n'ont pas présenté de différences par rapport aux témoins.

TABLEAU II. — Cinétiques de variations de la concentration en glycogène de l'hémolymphe des larves d'*Aedes aegypti* d'aspect normal, exposées à différentes doses de toxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
Durée (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,1	1,0
0 (témoins)		1,0 (0,26)	1,0 (0,26)	1,0 (0,26)	1,0 (0,26)
0,5		1,91 (0,49)	0,78 (0,20)	0,31 (0,08) b	0,39 (0,10) b
1		1 18 (0,31)	1,07 (0,28)	0,22 (0,06) b	0,67 (0,17)
1,5	1,0 (0,4)			3,05 (0,79) a	0,53 (0,14)
2		1,26 (0,33)	0,19 (0,05)	0,51 (0,13)	1,01 (0,26)
4		...	...	3,85 (1,00) a	(X)
6		1,36 (0,35)	0,74 (0,19)	6,30 (1,64) a	
8		...	...	2,80 (0,73) a	
12	0,47 (0,12)	2,16 (0,56) a	2,57 (0,67) a	(X)	
24	0,62 (0,16)	0,21 (0,05)	0,96 (0,25)		
36	0,29 (0,07)	0,77 (0,20)	1,65 (0,43) a		

a : augmentation et b : diminution par rapport aux témoins ($P \leqslant 0,05$).
La valeur 1,00 est attribuée aux valeurs mesurées chez les témoins au temps $T_0 = 0$. Les écarts types (entre parenthèses) sont donnés pour 2 répétitions (12 pour les témoins entre 0 et 8 h). (X) = nombre insuffisant de survivantes.

TABLEAU III. — Cinétiques de variations de la concentration en tréhalose de l'hémolymphe des larves d'*Aedes aegypti* d'aspect normal exposées à différentes doses de toxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
Durée (h)	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,1	1,0
0 (témoins)		1,0 (0,36)	1,0 (0,36)	1,0 (0,36)	1,0 (0,36)
0,5		0,93 (0,33)	0,61 (0,22)	0,59 (0,21)	0,70 (0,25) b
1		1,11 (0,40)	0,58 (0,20)	0,97 (0,35)	0,58 (0,20) b
1,5	1,0 (0,39)			1,19 (0,43)	0,14 (0,05) b
2		2,34 (0,84) a	0,60 (0,22)	1,11 (0,40)	0,046 (0,016) b
4		...	...	1,06 (0,38)	(X)
6		1,25 (0,45)	0,74 (0,26)	0,98 (0,35)	
8		...	...	0,52 (0,19) b	
12	2,16 (0,77)	3,19 (1,14) a	1,18 (0,42)	(X)	
24	2,66 (0,95)	3,20 (1,15)	1,15 (0,41)		
36	2,22 (0,86)	1,92 (0,50)	1,08 (0,39)		

a : augmentation et b : diminution par rapport aux témoins ($P \leqslant 0,05$).
La valeur 1,00 est attribuée aux valeurs mesurées chez les témoins au temps $T_0 = 0$. Les écarts types (entre parenthèses) sont donnés pour 2 répétitions (12 pour les témoins entre 0 et 8 h). (X) = nombre insuffisant de survivantes.

TABLEAU IV. — Cinétiques de variations de la concentration en glucose de l'hémolymphe des larves d'*Aedes aegypti* d'aspect normal exposées à différentes doses de toxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Durée (h)	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,1	1,0
0 (témoins)		1,0 (0,45)	1,0 (0,45)	1,0 (0,45)	1,0 (0,45)
0,5		1,0 (0,45)	0,79 (0,35)	1,07 (0,48)	1,31 (0,58)
1		2,1 (0,94)	1,16 (0,52)	0,54 (0,24)	3,31 (1,48) a
1,5	1,0 (0,45)	...	...	4,20 (1,9) a	5,51 (2,48) a
2		3,03 (1,36)	2,72 (1,22)	2,39 (1,07)	5,30 (2,38) a
4		...	...	6,17 (2,77) a	(X)
6		5,42 (2,44) a	2,63 (1,18)	9,18 (4,13) a	
8		...	...	8,81 (3,96) a	
12	2,76 (1,24)	7,55 (3,40)	7,53 (3,38)	(X)	
24	2,54 (1,14)	2,34 (1,05)	2,79 (1,25)		
36	0,59 (0,26)	4,53 (2,04) a	7,37 (3,30) a		

a : augmentation par rapport aux témoins ($P \leq 0,05$).

La valeur 1,00 est attribuée aux valeurs mesurées chez les témoins au temps $T_0 = 0$. Les écarts types (entre parenthèses) sont donnés pour 2 répétitions (12 pour les témoins entre 0 et 8 h). (X) = nombre insuffisant de survivantes.

TABLEAU V. — Cinétiques de variations de la concentration en composant y_4 de l'hémolymphe des larves d'*Aedes aegypti* d'aspect normal exposées à différentes doses de toxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

Durée (h)	Doses de toxine ($mg.l^{-1}$)				
	0 (Témoins)	0,01	0,02	0,1	1,0
0 (témoins)		1,0 (0,19)	1,0 (0,05)	1,0 (0,31)	1,0 (0,22)
0,5		1,52 (0,39)	0,97 (0,25)	0,48 (0,12)	0,02 (0,005) b
1		1,35 (0,35)	1,18 (0,30)	0,80 (0,20)	0,15 (0,04) b
1,5	1,0 (0,50)	...	...	0,73 (0,19)	0,06 (0,02) b
2		2,29 (0,59)	0,63 (0,16)	0,44 (0,11)	0,11 (0,03) b
4		...	...	1,02 (0,26)	(X)
6		2,22 (0,58)	1,35 (0,35)	1,09 (0,28)	
8		...	...	0,61 (0,16)	
12	2,87 (1,11)	5,16 (1,34)	1,36 (0,35)	(X)	
24	2,10 (0,82)	2,23 (0,58)	0,99 (0,25)		
36	4,48 (1,16)	1,87 (0,73) b	0,56 (0,14) b		

b : diminution par rapport aux témoins ($P \leq 0,05$).

La valeur 1,00 est attribuée aux valeurs mesurées chez les témoins au temps $T_0 = 0$. Les écarts types (entre parenthèses) sont donnés pour 2 répétitions (12 pour les témoins entre 0 et 8 h). (X) = nombre insuffisant de survivantes.

Discussion. — L'action de la toxine du *Bacillus thuringiensis israelensis* diffère très nettement de celle qu'exercent les parasites sur la glycémie des Moustiques. Qu'il s'agisse de *Lagenidium giganteum* parasitant les larves de *Culex quinquefasciatus* (4), de *Plasmodium berghei* chez les adultes femelles d'*Anopheles stephensi* (5) ou de *Romanomermis culicivorax* vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*, les parasites ont pour effet commun de provoquer une diminution globale de la glycémie, et paraissent donc détourner simultanément à leur profit le tréhalose et le glucose. En revanche, les perturbations entraînées par la δ-endotoxine du *B. T. i* présentent certaines caractéristiques dont nous allons examiner, maintenant, les traits essentiels.

L'augmentation des teneurs en glycogène dans les larves intoxiquées pourrait traduire, soit une rupture de la glycogénolyse, soit la stimulation d'un mécanisme hormonal de type insulinique se traduisant par l'incorporation de glucose dans les formes polyosidiques de réserve, comme cela a été récemment montré chez le Criquet (13). Toutefois, un mécanisme de type insulinique verrait ses effets masqués par la forte libération de glucose qui accompagne la chute des concentrations en tréhalose au cours de l'infection. Ce phénomène est caractérisé par le calcul de la corrélation entre glucose et tréhalose, dont la pente, positive chez les témoins (Fig. 2) ainsi que chez les animaux soumis aux deux plus faibles doses, devient négative sous l'action des doses les plus élevées (Fig. 3). Les pentes de régression qui caractérisent les relations obtenues avec les quatre doses

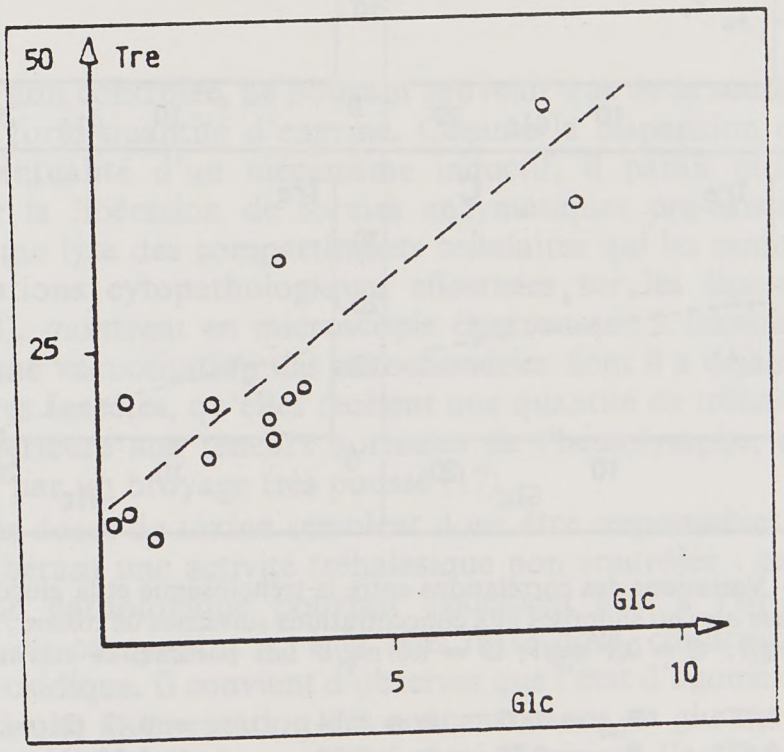


FIG. 2. — Corrélation entre la tréhalosémie et la glucosémie dans les larves saines d'*Aedes aegypti*. Les concentrations sont exprimées en mM ($N = 13$; $\rho = 0,876$; $P_{(\rho)} = 0,001$; $b = 3,76$; $\sigma_b = 0,53$).

étudiées permettent d'établir une relation dose/effet illustrée par la figure 4.

Par extrapolation, la droite de régression calculée avec les trois doses les plus faibles ($\rho = -0,997$; $a = -1,72$; $b = 0,632$) confère à la pente mesurée chez les témoins ($b = 3,76$) l'équivalence à une dose théorique « sans effet » extrêmement faible, $D_0 = 0,0002$ mg/l. Dès la DL_{100} atteinte, l'évolution de la pente paraît tendre vers une valeur limite.

Comme cela a déjà été observé chez l'Abeille (13, 14), le tréhalose et le glucose sont introduits quasi simultanément dans l'hémolymphe, où les tréhalases, rétro-inhibées par le glucose (16), libèrent celui-ci en fonction des besoins et de la concentration en tréhalose, ce qui explique l'existence d'une corrélation normale positive. En revanche, dans l'hypothèse d'une interruption de la glycogénolyse, la réserve de tréhalose serait progressivement épuisée, au fur et à mesure de la consommation du glucose. Or, les corrélations négatives observées sous l'action des plus fortes doses de toxine montrent que le tréhalose est rapidement hydrolysé, avec apparition de glucose libre non consommé : ceci suggère l'hypothèse d'une inter-

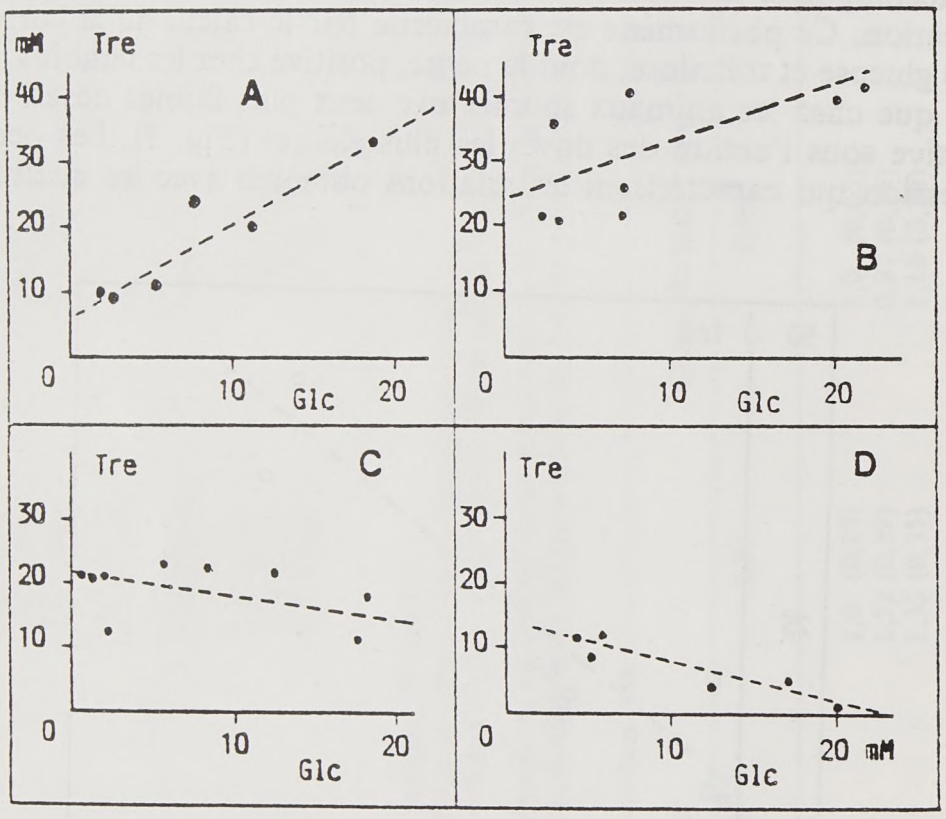


FIG. 3. — Variations des corrélations entre la tréhalosémie et la glucosémie dans les larves d'*Aedes aegypti* soumises aux concentrations suivantes de toxine : A = 0,01 mg/l; B = 0,02 mg/l; C = 0,1 mg/l; D = 1,0 mg/l. Les paramètres statistiques sont les suivants :

A : $\rho = 0,774$	$P_{(\rho)} = 0,07$	$b = 1,14$	$\sigma_b = 0,47$	$(N = 6)$
B : $\rho = 0,672$	$P_{(\rho)} = 0,06$	$b = 0,80$	$\sigma_b = 0,25$	$(N = 8)$
C : $\rho = -0,47$	$P_{(\rho)} = 0,20$	$b = -0,29$	$\sigma_b = 0,25$	$(N = 9)$
D : $\rho = -0,93$	$P_{(\rho)} = 0,007$	$b = -0,60$	$\sigma_b = 0,11$	$(N = 6)$

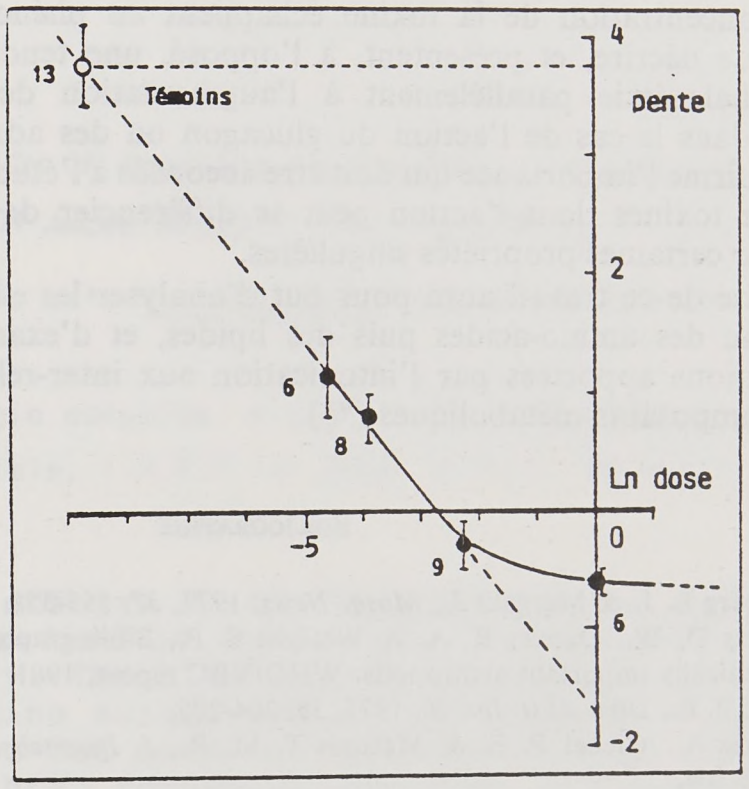


FIG. 4. — Relation doses/effets : variations des pentes de régression de la tréhalosémie sur la glucosémie en fonction du logarithme naturel des doses. Le nombre de couples de mesures est indiqué en regard de chaque point. Les pentes sont des nombres sans dimension (mM par mM). Les barres verticales indiquent les intervalles de confiance à P = 0,05.

conversion non contrôlée, ne pouvant provenir que de la soudaine libération d'une forte quantité d'enzyme. Comme la disparition du substrat exclut l'éventualité d'un mécanisme inductif, il paraît plus plausible d'envisager la libération de formes enzymatiques pré-existantes, sous l'action d'une lyse des compartiments cellulaires qui les renferment. Or, les observations cytopathologiques effectuées sur les tissus de larves infectées (8), montrent en microscopie électronique à transmission et à balayage, une vacuolisation des mitochondries dont il a déjà été montré, chez d'autres Insectes, qu'elles recèlent une quantité de tréhalase près de 10 fois supérieure aux teneurs normales de l'hémolymphe, et qui peut être libérée par un broyage très poussé (17).

Les fortes doses de toxine semblent donc être responsables d'une lyse cellulaire libérant une activité tréhalasique non contrôlée : cette activité enzymatique pathologique pourrait également être à l'origine de la disparition du composant y_4 à la plus forte dose, confirmant ainsi sa nature polyosidique. Il convient d'observer que l'état d'agonie correspond également à une augmentation des concentrations en glucose associée à une disparition du tréhalose, et ceci aussi bien sous l'action des faibles doses après un délai de 36 h que sous celle des fortes doses après des délais respectifs de 8 h et 2 h. En revanche, les larves soumises à la plus

faible concentration de la toxine échappent au phénomène que nous venons de décrire, et présentent, à l'opposé, une tendance à accroître leur tréhalosémie parallèlement à l'augmentation de la glucosémie, comme dans le cas de l'action du glucagon ou des adrénergiques (18). Ceci confirme l'importance qui doit être accordée à l'étude des très faibles doses de toxines dont l'action peut se différencier de celle des fortes doses par certaines propriétés singulières.

La suite de ce travail aura pour but d'analyser les effets de la toxine au niveau des amino-acides puis des lipides, et d'examiner, enfin, les modifications apportées par l'intoxication aux inter-relations entre ces divers composants métaboliques (**).

Bibliographie

1. Goldberg L. J. & Margalit J., *Mosq. News*, 1977, *37*, 355-358.
2. Roberts D. W., Daoust R. A. & Wraight S. P., Bibliography on pathogens of medically important arthropods. WHO/VBC report, 1981, 83.1.
3. Giebel P. E., *Diss. Abst. Int. B.*, 1975, *36*, 204-205.
4. Domnas A., Giebel P. E. & McInnis T. M. R., *J. Invertebr. Pathol.*, 1974, *24*, 293-304.
5. Mack S. R., Samuels S. & Vanderberg J. P. *J. Parasitol.*, 1979, *65*, 217-221.
6. Schmidt S. P. & Platzer E. G., *J. Nematol.*, 1978, *10*, 299.
7. Bailey C. H. & Gordon R., *J. Invertebr. Pathol.*, 1973, *22*, 435-447.
8. Nizeyimana B, Diplôme d'Études Approfondies, Université de Montpellier, 1982. 31 p.
9. Nizeyimana B., Thèse de 3e cycle, USTL, 1985, 330 p.
10. Bounias M., *Analusis*, 1976, *4*, 87-93.
11. Bounias M., *Analyt. Biochem.*, 1980, *106*, 291-295.
12. Bounias M., L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Masson, éd., 1983, 204 p.
13. Benkhay A., Thèse, Université de Bordeaux, 1986, 134 p.
14. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1978, *61A*, 13-18.
15. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1981, *69B*, 471-477.
16. Bounias M., *C. R. Acad. Sci.*, 1977, *285D*, 1263-1266.
17. Brant N. R., Hurlburt K. L. & Huber R. E., *Can. J. Biochem.*, 1979, *57*, 1210-1215.
18. Bounias M. & Pachéco H., *C. R. Acad. Sci.*, 1979, *289D*, 33-36 et 201-204.

(**) Les auteurs expriment leurs remerciements à M. le Pr C. Vago pour son appui et ses précieux conseils.

Recent Adv. Invert. Pathol. & Microbial." : Proc. IVth Internat. Colloq. Invert. Pathol., Aug. 18-22, 1986, Veldhoven, The Netherlands, 1 p.

BIOCHEMICAL MODE OF ACTION OF *Bacillus thuringiensis israelensis* δ-ENDOTOXIN ON *Aedes aegypti* LARVA (DIPTERA)

NIZEYIMANA, B.*, VIVARES, C.P.* and BOUNIAS, M.**

*Laboratoire de Pathologie comparée, U.S.T.L., F-34060 MONTPELLIER Cedex(France)

** Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A.-AVIGNON, F-84140 MONTFAVET (France)

The biochemical effects of the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* were studied on *Aedes aegypti* larvae (4th instar) reared at the laboratory. The kinetics of variations of the haemolymph carbohydrates and amino acids, and of the abdomen lipids were surveyed by quantitative TLC nanochromatography, 0.5; 1.0; 1.5; 2; 4; 6; 8; 12; 24 and 36 hrs, following the oral administration of 0.01; 0.02; 0.1 and 1.0 mg.l^{-1} (12.10^3 I.U.mg^{-1}).

A release of glucose from trehalose hydrolysis was already observed at the lower but not at the median doses and was strongly marked at the higher dose. Among the amino acids, leucine, proline and cysteine concentrations were depressed at the lower dose, and threonine at all but the higher one. By contrast, alanine was increased at the lower toxin concentration whereas arginine, glycine, alanine and methionine were increased at the higher doses. Free fatty acids are markedly increased at the lower doses and depressed at the higher ones. The 1-2 diacyl glycerols are increased at median doses, while the phospholipid fraction drops at low and median doses, but increase at the higher one.

Following a statistical examination of the kinetic of variations of each biochemical parameter, a number of correlations appeared between couples of metabolites in control insects, and their variations were determined according to toxin lower and median doses.

A negative correlation between lipid and carbohydrate is maintened at lower and median doses and broken at the hiher one. A positive correlation observed between amino acid and carbohydrate is broken at the two higher doses. The correlation between lipid and amino acid is weakly positive in controls and negative with high significance under the action of the toxin.

The results give evidence that low doses of toxin may share strong metabolic deviations in the same or opposite sense as the hiher ones, and that high doses effects are consistent with the biochemical effects of cellular and membrane alterations.

Recent Adv. Invert. Pathol. & Microbial." : Proc. IVth Internat. Colloq. Invert. Pathol., Aug. 18-22, 1986, Veldhoven, The Netherlands, 1 p.

COMPARATIVE EFFECTS OF STARVATION AND CHLAMYDIAN DISEASE ON HAEMOLYMPH AND FAT BODY LIPIDS AND CARBOHYDRATES IN *Gryllus bimaculatus* (ORTHOPTERA)

VIVARES, C.P.*, BOULBES-DACLINAT, B.* and BOUNIAS, M.**

*Laboratoire de Pathologie comparée,ERPAM,U.S.T.L.,F-34060 MONTPELLIER Cedex (France).
**Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A.-AVIGNON - F-84140 MONTFAVET (France).

The biochemical effects of the experimental inoculation of crickets with *Rickettsiella grylli* were compared to those of starvation, in order to appreciate the destructive effects of the disease on fat body.

In both cases, a modification of the free fatty acids pattern occurs in fat body after 3 days and then turns back to normalité except the ratio satured/unsatured which remains higher than in controls. The phospholipid fraction drops to very low values in haemolymph, but oscillates in fat body about mean values lower than in controls: a more pronounced depress is observed in surviving diseased insects after 15 days.

In starvation conditions, fat body 1-2 and 1-3 diacyl glycerol (DG) exhibit a strong decrease at 3 days and 7 days, and a peak at day 5 (both) and at day 10 (1-3 DG). By contrast, both 1-2 and 1-3 DG stay at very low levels under infection conditions. In the haemolymph of diseased insects, an important peak of 1-3 DG occurs at day 3. Triacyl glycerols are rapidly exhausted in the haemolymph of both infected and starved insects. It is interesting to note that, in fat body, their oscillations are in phase opposition with the variations of most of the other lipid classes.

Trehalose and glucose concentrations roughly show phase variations in haemolymph and fat body, under either starvation or infection conditions. Starvation results in a general decrease of carbohydrates whereas in diseased insects, large amplitude variations can be observed in fat body, and to a lesser extend in haemolymph, about mean values higher to the initial ones. It should be noted that trehalose is poorly converted into glucose 15 days after inoculation.

As a conclusion, the major differences between the respective effects of the rickettsian disease and of the starvation conditions can be discerned through the rapid exhaustion of carbohydrates in both haemolymph and fat body of starved insects. Differences are less marked in the case of lipid variations.

C. R. Soc. Biol., 1986, *180*, 663-668.

Lutte systémique.

Le blocage du fonctionnement des hémocyanines de l'Acarien, *Varroa jacobsoni*, comme base physiologique spécifique d'un traitement par voie systémique de la varroatose de l'Abeille

par DRAGUTIN POPESKOVIĆ * et MICHEL BOUNIAS **

* *Département de Biologie,*
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Belgrade,
Bul. JNA 18, P. O. Box 370, 1100 Beograd, Jugoslavija.
** *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon,*
F84140 Montfavet, France.

(reçue le 29 décembre 1986).

Summary. — Former experiments in struggle against the mite *Varroa jacobsoni*, have shown that externally used remedies did not result in a satisfactory control of this dangerous honeybee parasite. A new approach is thus proposed, combining both a systemic treatment (internal way, via the honeybee haemolymph) and a specific physiological target: the oxygen transport system of the parasite.

Following a comparative analysis of minerals in the host and the parasites, it appeared that the mite contains much larger amounts of copper than the honeybee, which suggested the presence in the former of hemocyanin pigments which do not exist in the insect. A first set of experiments showed that copper antidotes and chelators given to the parasited honeybees in sucrose syrups, by means of the nourishment tanks situated inside the hives, actually caused a high mortality of the parasite relatively to the bees. Further researches are in progress in this way, and might associate the anti-varroatosis treatments with antidotes for toxical injuries.

Résumé. — Les essais de lutte effectués jusqu'ici contre le Chélicérate *Varroa jacobsoni* ont montré que les pesticides chimiques utilisés par voie externe ne montrent qu'une efficacité très limitée contre ce dangereux parasite de l'Abeille. Une nouvelle forme de lutte est proposée, dans laquelle une administration systémique (voie interne, *via* l'hémolymphe de l'hôte) est combinée à l'utilisation d'une cible physiologique spécifique : le systeme de transport d'oxygène du parasite. A la suite d'une analyse comparée de la composition minérale de l'hôte et du parasite, il est apparu que ce dernier contient de plus grandes quantités de cuivre que l'Abeille, ce qui suggère l'existence, dans le parasite, de pigments du type des hémocyanines, absents chez les insectes. Une première série d'expériences a montré que des antidotes et des chélateurs du cuivre,

administrés *per os* aux abeilles parasitées, dans les sirops introduits à l'intérieur des ruches, dans les bacs de nourrissement, ont effectivement entraîné une forte mortalité du parasite, relativement aux abeilles. Les recherches en cours, sur ce sujet, visent à associer les traitements systémiques contre le *Varroa* à des antidotes destinés à la protection toxicologique spécifique des abeilles.

L'extension et l'intensification du parasitisme des ruches par *Varroa jacobsoni* constitue une très grave menace dans toute l'Europe, non seulement pour l'apiculture proprement dite, mais pour une grande part de la production agricole végétale, tributaire d'une pollinisation efficace dont seules les abeilles permettent l'organisation contrôlée à grande échelle (1). Les méthodes prophylactiques employées jusqu'à présent, et en particulier les traitements acaricides appliqués par voie externe, n'ont montré qu'une efficacité très limitée. De plus, l'emploi de pesticides non sélectifs, souvent dommageable pour les abeilles elles-mêmes (2), peut également présenter un danger du fait des résidus susceptibles de contaminer les produits commercialisables de la ruche (miel, pollen, propolis, gelée royale...) (3). Il paraissait donc nécessaire d'orienter les recherches concernant les moyens de lutte à la fois vers un mode d'application systémique (transmis par l'Abeille, par voie interne) et vers des cibles toxicologiques spécifiques du parasite.

Principes généraux. — A. Bases phylogénétiques. — Les Acariens appartiennent à la classe des Arachnides, c'est-à-dire, comme tous les Chélicérates, à des Arthropodes relativement primitifs, susceptibles de présenter des caractères plus archaïques que les Insectes, parmi lesquels les Hyménoptères constituent l'un des Ordres les plus évolués. Les Chélicérates sont directement issus des Trilobites, lesquels vivaient voici 500 millions d'années. Or, les recherches paléobiochimiques ont montré que ces derniers possédaient de fortes concentrations de cuivre, ce qui laisse supposer qu'ils possédaient en abondance des pigments cuproprotéiques tels que les hémocyanines qu'on retrouve encore actuellement dans l'hémolymphe des Araignées (4) et chez les Crustacés Décapodes (5).

B. Bases chimiques. — Lors de précédentes recherches (6), la composition minérale du corps de *Varroa jacobsoni* avait été comparée à celle de l'Abeille : or, les résultats avaient fait apparaître d'importantes différences en ce qui concerne précisément le cuivre, dont les teneurs peuvent atteindre, chez le parasite, six fois la valeur de celles mesurées chez son hôte (7). Il était donc légitime de postuler l'existence, chez *Varroa*, de molécules organo-cuivrées analogues aux hémocyanines, susceptibles de fournir une cible spécifique au niveau du système de transport d'oxygène : sachant, en effet, que les Insectes, et en particulier l'Abeille, sont dépourvus de tels systèmes et utilisent la voie trachéale amenant directement l'oxygène au contact des cellules, il paraît vraisemblable que la respiration du parasite puisse être sélectivement affectée

par un blocage du fonctionnement des cupro-protéines de l'hémolymphe (8).

Animaux et techniques. — Les abeilles proviennent d'un rucher de race *carnica*. Deux sortes de traitements ont été appliqués : les premiers, à long terme (16 jours), ont été effectués sur des ruchettes contenant de 15 à 20 000 individus ainsi qu'une reine, tandis que les seconds, à court terme (4 jours) ont été pratiqués dans des cagettes de bois pouvant contenir une centaine d'individus qui, dans ce cas, ne sont pas accompagnés d'une reine. Les sirops de nourrissement sont administrés par les bacs nourrisseurs de ruches, dans le premier cas, et par des tubes de verres de 10 ml dans le second cas. Chaque jour, les abeilles mortes sont dénombrées sur le fond des ruchettes et des cagettes, constitué d'un grillage à fines mailles à travers lequel tombent les parasites morts qui sont recueillis et dénombrés sur un support placé sous le grillage. A la fin des expériences, les cagettes sont réfrigérées et la population totale des parasites présents est déterminée sur les abeilles engourdies par le froid.

Les composés utilisés à titre préliminaire, au cours de cette série d'essais, ont été choisis parmi les antidotes ayant été autrefois utilisés dans les cas d'intoxication par le cuivre, tels le sulfate cuivrique lui-même (9), largement utilisé, par ailleurs, comme antifongique, et des agents contenant des radicaux thiols, tels le thiosulfate de sodium (10) et le dithio 1-2 glycérol (dimercapto propanol, ou B. A. L.) (11) complexant les métaux lourds (12).

Les probabilités de signification $P_{(\rho)}$ associées à la valeur des coefficients de corrélation (ρ) ont été calculées à partir de l'équation de distribution de « t » de Student. Les pentes de régression sont désignées par b et leurs écarts-types par σ_b.

Résultats. — Le Tableau I indique les mortalités observées après incorporation, dans le sirop de nourrissement, de sulfate cuivrique. Une relation doses/effets peut en être déduite : la courbe naturelle (Fig. 1 A) est pratiquement transformée en une droite par un changement de coordonnées exprimant les variations de la mortalité absolue MA sous forme $e^{MA/100}$ en fonction de la racine carrée des doses (Fig. 1 A et C). Dans ce cas la corrélation présente les caractéristiques suivantes (N = 4 couples de mesures) : $\rho = 0{,}996$ ($P = 0{,}004$); $b = 410{,}4$ ($\sigma_b = 26{,}0$). Les trois couples de points correspondant au traitement s'inscrivent sur une hyperbole : en coordonnées bi-inversées, la corrélation est extrêmement forte (Fig. 1 C) : $\rho = 0{,}9996$ ($P = 0{,}016$); $b = 75 \times 10^{-6}$ ($\sigma_b = 2 \times 10^{-6}$). Une estimation de l'hypothétique « dose sans effets » (DSE) peut être déduite de la relation entre la mortalité absolue (MA) et le logarithme naturel de la dose (L^nd), soit pour les trois couples de points correspondant aux traitements : $\rho = 0{,}964$ ($P = 0{,}17$); $b = 105{,}9$ ($\sigma_b = 29{,}2$) d'où l'extrapolation assigne à $M = 0$ la concentration correspondante : $d = 0{,}00245$ ‰ soit $d = 76$ µM (Fig. 1 D).

TABLEAU I. — Influence de la concentration du sulfate cuivrique introduit dans le nourrisseur sur la mortalité absolue de *Varroa jacobsoni* en ruchettes avec reines, au bout de 16 jours.

Concentrations : %	0,00	0,01	0,10	1,00
mM	0,00	0,31	3,1	31
Mortalité absolue de *Varroa*	33	111	470	598
Mortalité absolue des abeilles	5	ND	10	ND

ND : non déterminée.

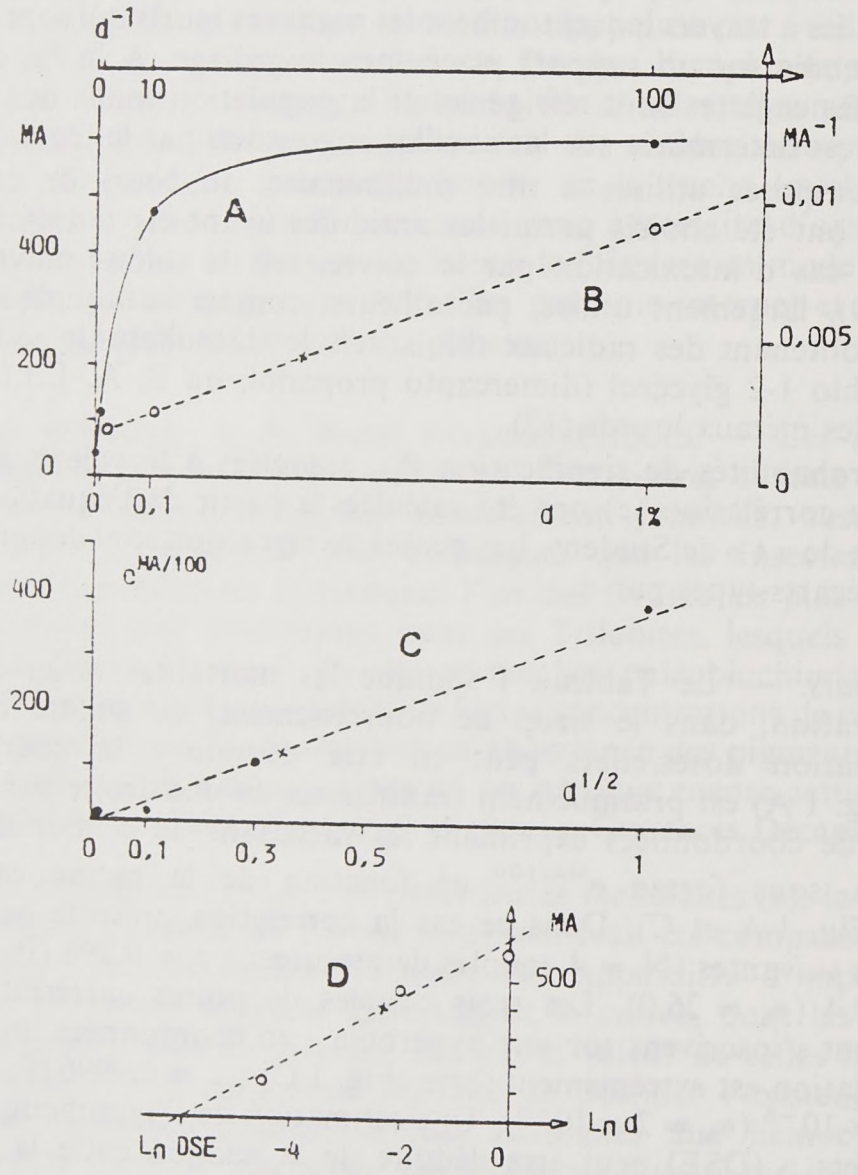


FIG. 1. — Relations entre la mortalité absolue (MA) des parasites et la concentration (d = dose % : 1 % = 31 mM) en $CuSO_4$ administré *per os* aux abeilles. A : coordonnées naturelles. B : coordonnées bi-inversées (témoins exclus). C : coordonnées transformant la courbe complète en une droite. D : forme semi-logarithmique permettant d'évaluer la dose « sans effets » (DSE) hypothétique.

Le Tableau II indique les résultats préliminaires observés avec le thiosulfate de sodium et le dimercapto-propanol, administrés en cagettes, par comparaison avec la mortalité basale observable dans des conditions expérimentales analogues chez des abeilles non parasitées recevant un sirop de saccharose 2M.

TABLEAU II. — Mortalités absolue (MA) et relative (MR %) observées en cagettes au bout de 4 jours dans le cas d'abeilles recevant du thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) ou du dimercapto propanol (DMP).

Composés :		Saccharose seul	+ $Na_2S_2O_3$		+ DMP	(v/v)
Doses		2 M	20 %	30 %	0,5/1	1/1
Nombre total d'abeilles		50	144	107	32	27
Mortalité des abeilles	MA	2	7	9	4	0
	MR	4 %	4,8 %	8,4 %	12,5 %	0
Mortalité de *Varroa*	MA	(*)	10	14	15	11
	MR	—	90,9 %	93,3 %	100 %	100 %

(*) Abeilles non parasitées.

Le témoin exprime la mortalité des abeilles saines recevant seulement du saccharose 2 M dans des conditions expérimentales analogues.

Discussion et conclusions. — L'existence d'une relation doses/effets reliant les concentrations de sulfate cuivrique à la mortalité des acariens, et les fortes proportions (91 à 100 %) de parasites tués par des agents complexants du cuivre administrés dans le sirop de nourrissement des abeilles confirment la validité de la double hypothèse de travail formulée en introduction, à savoir : 1) il est vraisemblable que l'existence d'un système de transport d'oxygène par des cupro-protéines de type hémocyanines puisse constituer un point de vulnérabilité spécifique du parasite; 2) l'administration des substances destinées à la lutte peut être effectuée par voie systémique, c'est-à-dire transmise directement au parasite par l'hémolymphe de l'hôte. Il convient, certes, d'attirer l'attention sur le fait que ces expériences avaient avant tout pour but d'éprouver une théorie, plutôt que de sélectionner les composés les plus efficaces dans la lutte contre *Varroa*. Cette seconde phase est maintenant engagée, dans le cadre de la collaboration franco-yougoslave : elle va se développer d'une part avec la recherche des meilleurs moyens de bloquer le fonctionnement des hémocyanines du parasite, et d'autre part, avec les indispensables recherches toxicologiques destinées à analyser parallèlement l'impact des composés actifs contre *Varroa* sur l'abeille elle-même.

Les substances introduites dans les nourrisseurs n'étant accessibles qu'aux seules abeilles, cette voie pourrait permettre, en outre, l'admi-

nistration sélective aux individus de la colonie de substances présentant une action de type antidote contre les effets de certains pesticides, dont l'abeille serait, ainsi, électivement protégée. La recherche et l'étude du mode d'action de telles substances feront l'objet de travaux ultérieurs au cours desquels nous rechercherons en priorité l'interaction possible des substances appliquées à la lutte contre *Varroa* avec les effets des différents dérivés toxiques agrochimiques auxquels l'abeille est exposée du fait des traitements phytosanitaires.

Bibliographie

1. Barbier E., La Pollinisation des Cultures, Pourquoi, Comment, Ed. par l'auteur, 1986, 477 p.
2. Emmanouel N. G., Santas L. A. & Tambouratzis D. G., *Acarology* (C. R. 6e Symp. Internat., 1982), 1984, *2*, 1099-1106.
3. Robaux P., *Rev. Fr. Apic.*, 1986, *458*, 562-563.
4. Preaux G. & Gielens C., *In:* Copper Proteins and Copper Enzymes, Ed. R. Lontié, C. R. C. Press, 1984, 159-205.
5. Redmond J. R., Hemocyanins, *In:* Chemical Zoology, Ed. M. Florkin, and B. T. Scheer, Acad. Press, New York and London, 1971, 129-144.
6. Popesković D. & Pantic S., *In:* 3e Symp. Internat. sur la *Varroa*, Split (Yougoslavie), 1984, 1 p.
7. Popesković D., 3e Symp. Internat. sur la *Varroa*, Split (Yougoslavie), 1985, Abst., 1 p.
8. Popesković D., 3e Symp. Internat. sur la *Varroa*, Split (Yougoslavie), 1984, 33-35.
9. Wilson S. A. K., *Brain*, 1912, *34*, 295.
10. Dambipe X., *In:* Ocular Pharmacology (Afoener Ed.), Mosby (USA), 1978, 342.
11. Neweel P., *Am. J. Ophtalmol.*, 1949, *32*, 161.
12. Frejaville J. P., Bismuth C. & Conso F., Toxicologie Clinique, Flammarion, 1971, 216.

III - BIOCHIMIE TRAUMATOLOGIQUE VEGETALE

Collaborations : Université d'Avignon (Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales)

Université d'Orléans : Recherche Forestière

Laboratoire des Médiateurs Chimiques : INRA-Brouessy.

A - Etude de la résistance des pins sylvestres aux attaques des scolytes et de leurs champignons associés.(*)

Les recherches engagées depuis deux ans sur ce sujet ont fait l'objet d'une communication au Colloque International qui s'est tenu du au 30 Août à Orléans.

Au cours de 1986, l'étude de la structure d'une fraction hétérosidique isolée en 1985 en collaboration avec le laboratoire des Médiateurs Chimiques (INRA-Brouessy) a été complétée d'une part avec l'étude enzymatique de la nature de la liaison osidique, et d'autre part avec l'élaboration de techniques de séparation des phénols libres et de leur caractérisation par spectrophotométrie en phase solide. D'autres hétérosides isolés ultérieurement ont été également analysés.

L'étude des spectres glucidiques dans différents arbres d'Orléans classés par les forestiers en "vigoureux" et "non vigoureux", (respectivement dominants et dominés) a été parachevée.

a) Etude enzymatique de la structure de la fraction hétérosidique |10+15|.

L'hétéroside |10+15| a été incubé en milieu tampon phosphate 100 mM pH 6,8 en présence soit d'α-glucosidase soit de β-glucosidase dans les conditions suivantes :

(*) Développements devant aboutir à un projet de Mémoire de Recherche de Mme Daurade.

α-glucosidase (serva réf : 22823). Titre : 57 u./mg (1 u. hydrolyse 1 µmole/mn à 25°C et à pH 6). Concentration : 1 mg/50 ml soit : 1,14 unité/ml.

β-glucosidase (serva réf : 22830). Titre : 10 u./mg. Concentration: 1 mg/20 ml soit : 0,5 unité/ml.

Les incubations ont duré 2 heures à 30 °C et des prélèvements ont été effectués à intervalles de 15 mn pendant la première heure et de 30 mn pendant la seconde.

Le tableau ci-dessous indique les résultats (en nanomoles) obtenus pour les 4 pics constituant la fraction, après action de l'αglucosidase.

(Tableau 1)	pic n°1	pic n° 2	pic n° 3	pic n° 4
To	0,96	4,51	6,31	2,13
To + 2h	0,80	4,65	6,31	2,13

L'α-glucosidase n'attaque donc pas les liaisons.

Le tableau 2 indique les résultats obtenus après action de la β-glucosidase, et illustés par la figure 1.

Tableau 2		Glucose lié (nmoles équiv. hétérosidique)			
	Glucose libre nmoles	fraction 1	fraction 2	fraction 3	fraction 4
To	0,12(0,00)	0,86(0,00)	2,66(0,00)	7,47(0,00)	2,56(0,00)
15 mn	0,86(0,74)	0,62(-0,24)	2,47(-0,19)	6,67(-0,8)	1,22(-1,34)
30 mn	0,58(0,46)	0,51(-0,35)	2,09(-0,57)	7,69(-0,22)	1,11(-1,45)
45 mn	1,21(1,09)	0,47(-0,39)	1,13(-1,53)	5,93(-1,54)	1,39(-1,17)
1 h	1,55(1,43)	0,22(-0,64)	0,92(-1,74)	5,27(-2,2)	1,30(-1,26)
1 h 30	2,69(2,57)	0,34(-0,52)	1,15(-1,51)	5,07(-2,4)	1,33(-1,23)
2 h	3,34(3,22)	0,18(-0,68)	0,78(-1,88)	4,89(-2,58)	1,34(-1,22)

Les liaisons hétérosidiques des 4 fractions constituant l'extrait |10+15| sont attaquées par la β-glucosidase. Une étude des corrélations correspondantes est en cours afin de déterminer quelles sont celles des 4 fractions qui rendent compte le plus étroitement de la libération du glucose.

La structure recherchée est donc de nature β-glucosidique :

(R=aglycone phénolique)

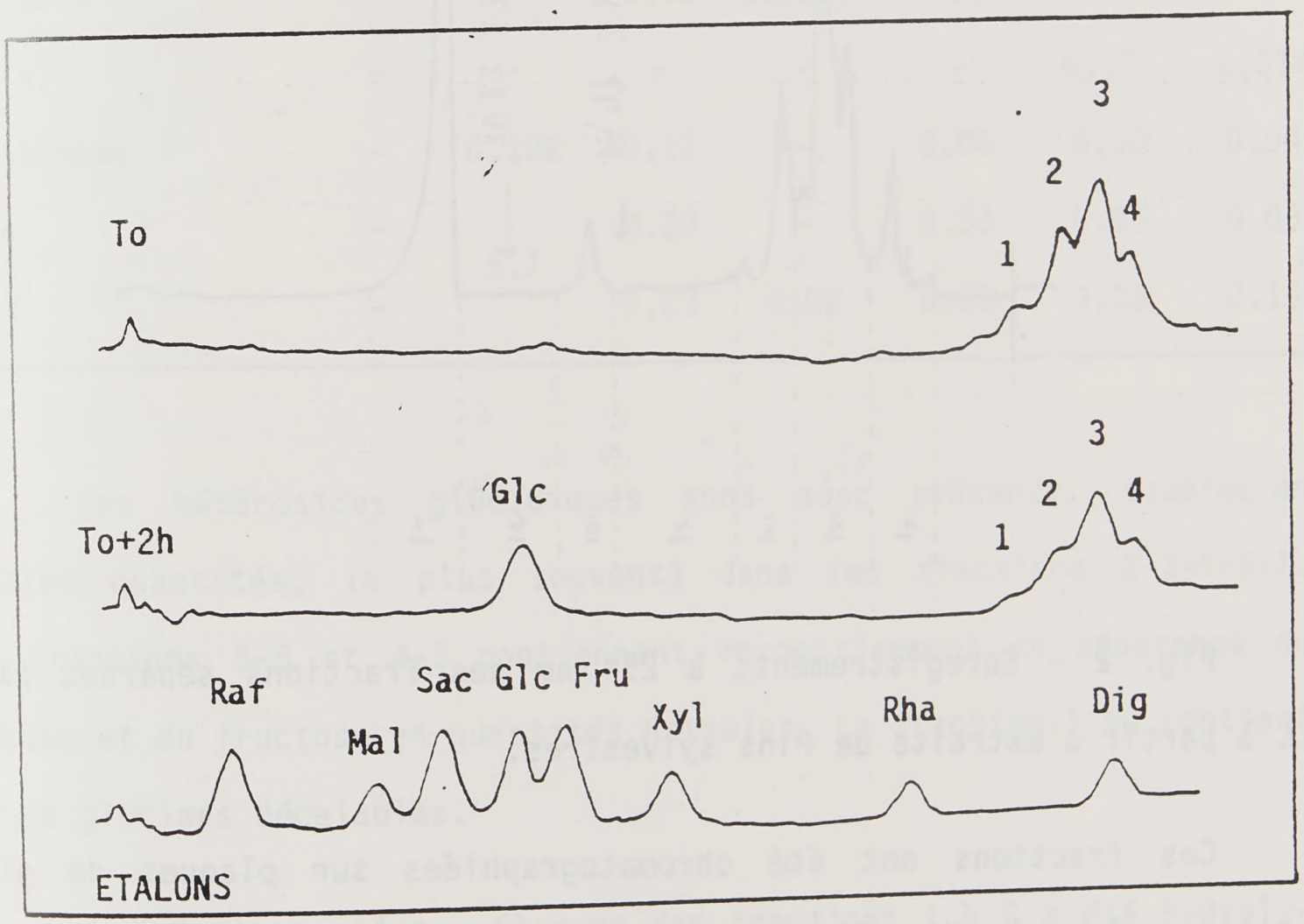


Fig. 1 - Hydrolyse par la β-glucosidase des composants de la fraction |10+15|.

b) - Analyse d'autres fractions hétérosidiques isolées par HPLC.

Des extraits provenant du broyage de 1 g de liber de Pins sylvestres dans 6 ml d'eau ont été injectés en HPLC. Sept fractions absorbant significativement à 254 nm (fig. 2) ont été recueillies et transmises au laboratoire par Madame FREROT.

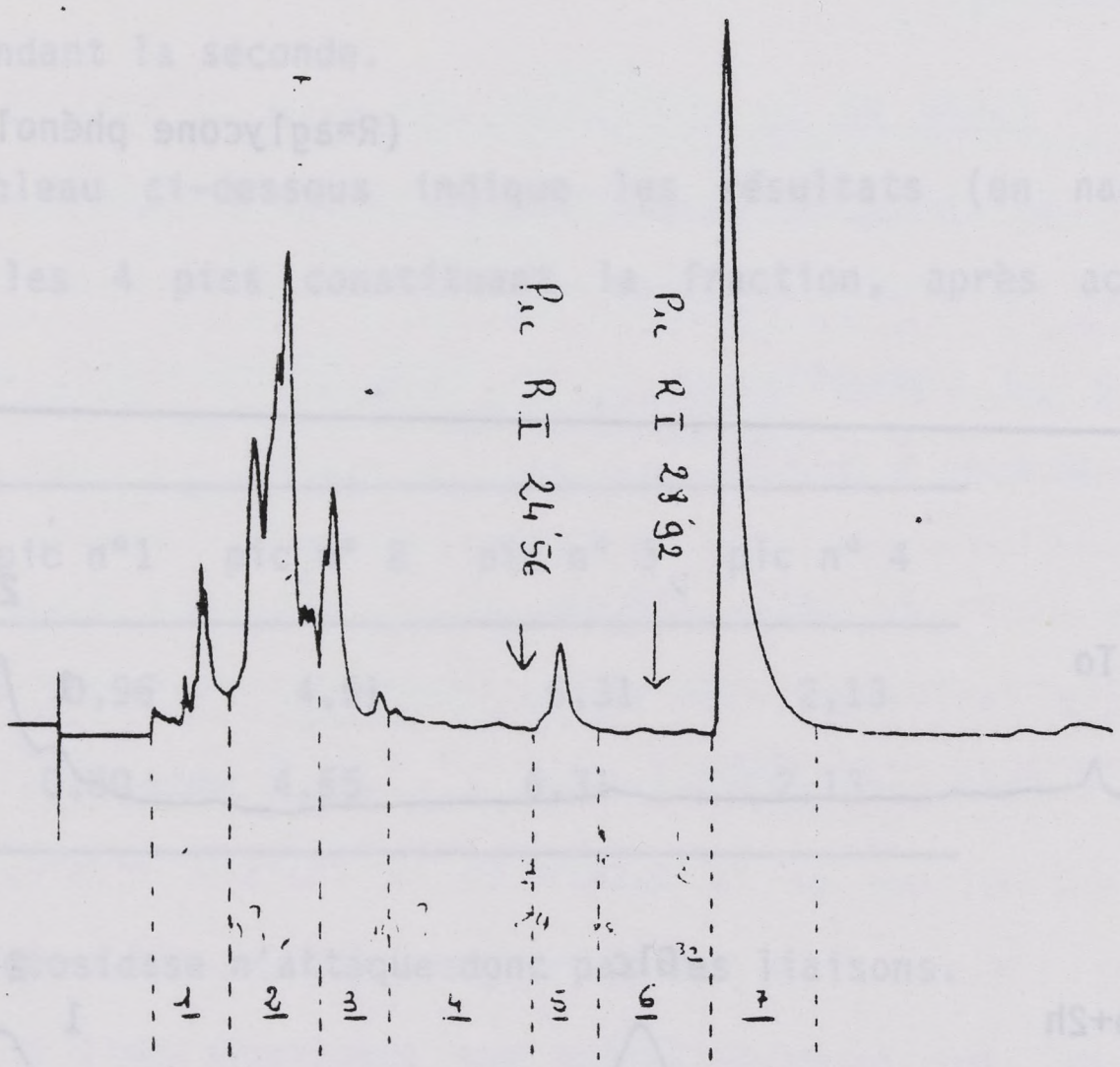


Fig. 2 - Enregistrements à 254 nm des fractions séparées par HPLC à partir d'extraits de Pins sylvestres.

Ces fractions ont été chromatographiées sur plaques de gel de silice : les glucides (libres ou liés) ont été révélés par le NEDIAC (Bounias, 1980) et les hétérosides par leur absorbance à 310 nm.

Les enregistrements U.V. n'ont pas donné de résultats interprétables. En revanche, la détection des glucides a donné les résultats indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 - Glucides (nmoles) observés avant hydrolyse au niveau des étalons indiqués par leur nom ou par les numéros de pics correspondant au spectre complet observé chez le Pin sylvestre.

Fractions n°	1	2	3	4	5	6	7
Poids des lyophilisats (mg)	2,3	1,38	1,76	2,42	3,28	1,30	2,22
Volumes (µl)	660	400	500	650	490	370	630
Dépôts (µl)	1	1	1	1	0,5	1	1
Glucose	-	-	-	0,02	4,15	5,83	0,09
Fructose	-	-	0,10	10,66	14,29	0,95	-
17-(n)	-	-	-	-	-	0,007	0,014
Digitoxose	-	0,102	0,17	-	0,06	0,10	0,04
19 A	-	5,7	0,20	-	0,03	0,05	0,03
19 B	-		0,23	0,02	0,09	0,09	0,19

Des hétérosides glucidiques sont donc présents, (quoiqu'en faibles quantités, le plus souvent) dans les fractions 2-3-5-6-7. Les fractions 5-6 et 4-5 contiennent respectivement en apparence du glucose et du fructose en quantités notables. La fraction 1 ne contient pas de glucides décelables.

◇ Hydrolyse acide - Chacune des fractions 1 à 7 a été hydrolysée en milieu HCl 2N (final) pendant 6 h à 50°C.

Le tableau 4, ci-dessous, indique les résultats numériques.

Tableau 4 - Composition glucidique des hydrolysats des 7 fractions absorbant à 254 nm par HPLC.

Fractions	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (nmoles)	-	-	0,54	0,39	6,28	2,64	-
Fructose (nmoles)	-	0,18	0,14	0,40	11,56	0,14	-

La fraction 5 recèle le glucose et le fructose qu'elle contenait avant hydrolyse. Le composant présent dans la fraction 4 n'était apparemment pas du fructose mais un ose lié dont la forme libre n'a pas été retrouvée après hydrolyse.

c) Analyses complémentaires dans les arbres du "clone orléans".

Tableau 5

Glucides	Arbres "dominants"(*) n° 2		n° 3		Arbre "dominé"(*) n° 4	
	1 m	3 m	1 m	3 m	1 m	3 m
Raffinose	2,11	1,03	0,71	0,54	0,32	0,32
Saccharose	54,84	51,11	37,64	55,63	30,5	53,2
Glucose	71,87	39,65	20,34	37,03	199,4	20,7
Fructose	48,92	29,1	27,27	31,1	54,2	31,9
Xylose	0,57	3,46	0,42	0,42	0,24	0,17
Rhamnose	0,24	0,26	0,51	0,64	0,00	3,82
Digitoxose	-	-	-	-	0,00	17,42

(*) classification visuelle provisoire.

L'ensemble des résultats (1985-1986) a permis la comparaison des divers indices physiologiques dans les deux classes considérées par appréciation visuelle de l'ONF, comme dominantes ou dominées (tableau 6).

Tableau 6 - Comparaison des caractéristiques physiques des compositions glucidiques (nmoles/mg) et des indices de vigueur tels que définis par Waring et al. (1980) : RRS et par Mahoney et al. (1978) : PGR dans les deux classes distinguées par les forestiers.

	Classe "dominants			Classe "dominés"		
	$\bar{x}$	(N)	σ_x	$\bar{x}$	(N)	σ_x
Age (années	34.4	(5)	2.1	34.6	(5)	1.5
Diamètre (cm)	62.5	(5)	7.2	53.6	(5)	10.7
INdice PGR	1.184	(5)	0.318	1.241	(5)	0.108
Indice RRS	0.218	(5)	0.058	0.184	(5)	0.047
Glucose	32.2	(10)	17.1	30.1	(7)	12.9
Fructose	34.4	(10)	15.3	34.1	(8)	14.1
Saccharose	151.3	(10)	133.9	190.0	(8)	188.7
(Xyl+Rha+Dig)	2.2	(10)	4.6	6.7	(8)	6.6

Il n'apparaît pas, à ce stade, de cohérence entre la classification des forestiers et les diverses mesures d'indices physiologiques et biochimiques. L'analyse des corrélations entre ces divers critères se poursuivra donc à partir des arbres considérés un par un, toutes catégories confondues, afin de rechercher toute cohérence éventuelle entre certains des indices mesurés (indépendamment de la classification initiale, manifestement caduque).

d) Analyse chromatographique des phénols libres (aglycones).

(Collaborateurs : Mme Daurade, LBC ; M. Lizzi, Univ. Avignon)

Les propriétés éluantes de 107 combinaisons différentes binaires, ternaires, quaternaires et quintenaires de solvants composés à partir des éléments suivants, ont été expérimentées sur des pla-

ques comportant comme étalons les acides chlorogénique, protocatéchique, cinnamique, caféique, o.coumarique, férulique, sinapique, hydroxybenzoïque, et la rutine.

Composants potentiels des éluants :

Benzène, toluène, hexane, chloroforme, trichoréthylène, dichlorométhane, acétate d'éthyle	Pouvoir éluant : faible
Ethanol, propanol, butanol, alcool amylique	Fort pouvoir éluant
Acétonitrile, acétone, eau, acide acétique	Solutropes

L'imprégnation des plaques par un tampon améliore la résolution en réduisant les traînées. Le tampon phosphate à pH 6,8 donne de meilleurs résultats qu'à pH 9,2.

L'éluant suivant a été retenu pour les essais ultérieurs :

Toluène	n-butanol	acétone	ac.acétique	eau	
74	20	2	2	2	(v/v)

La figure 3 illustre les chromatogrammes correspondants.

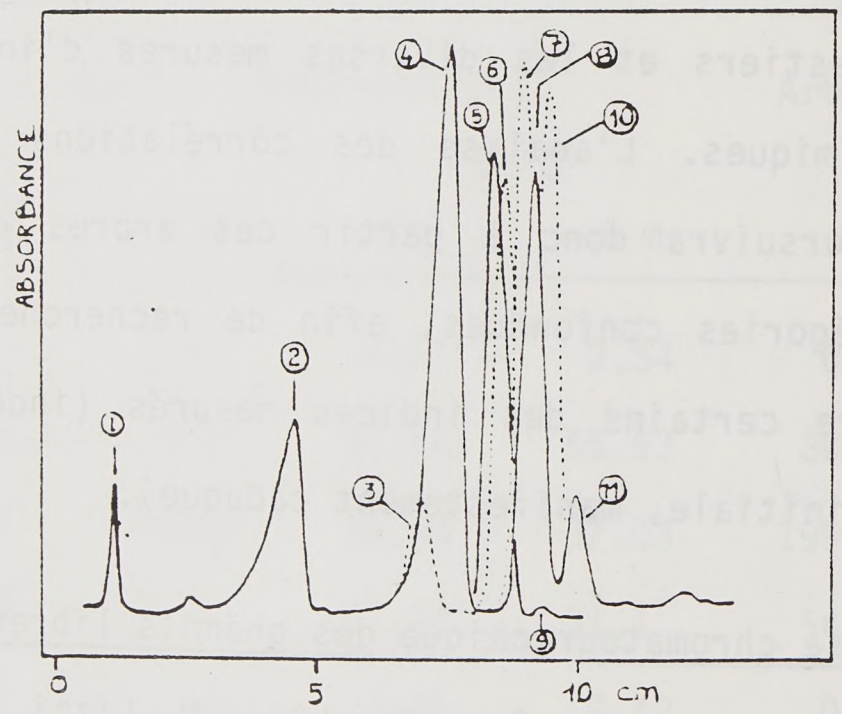


Fig. 3 - Séparation chromatographique d'une série de composés phénoliques sur plaques de gel de silice : enregistrements à λ=310 nm. Eluant : toluène, n-butanol, éthanol, acide acétique, eau (74-20-2-2v/v). 1 =ac. chlorogénique ; 2 =ac. o.protocatéchique ; 3 =ac. protocatéchique; 4 = ac. caféique ; 5 =ac. sinapique ; 6 =ac. iso-férulique ; 7 =ac. férulique ; 8 =ac. o.coumarique ; 9 =ac. p.hydroxybenzoïque (λ max=254 nm) ; 10 =ac. p.coumarique ; 11 =ac. cinnamique.

Le tableau 7, ci-dessous, présente les mobilités (M_R) de divers composés phénoliques, relativement à celle de l'acide cinnamique pris comme référence, dans le cas de 2 variantes de l'éluant précédent.

	éluant A	éluant B
Ac. cinnamique : M_R(Rf)	1,00(0,427)	1,00(0,58)
Ac. chlorogénique	0,002-0,13	0,001-0,18
acide protocatéchique	0,29	0,22
acide sinapique	0,87	0,75
acide isoférulique	1,12	0,73
acide férulique	0,61	0,85
acide caféique	0,67	0,68
acide protocatéchique	1,13	0,62
acide p. coumarique	1,08	0,88
acide o. coumarique	1,08	0,87
acide p. hydroxybenzoïque	1,13	0,90

Eluant A : Toluène-isobutanol-ac. acétique-eau (74-20-4-2)
Eluant B : Toluène-n butanol-ac. acétique-acétone-eau (74-20-2-2-2)

La révélation des phénols peut s'effectuer à l'aide d'un des réactifs suivants :

◇ para nitraniline diazotée (Bray et al., 1950 ; Swain, 1953 etc.)

◇ Réactif de Benedikt (Reznik et Hegger, 1961)

◇ Vanadate d'ammonium (Bajaj et ahuja, 1986)

La p. nitraniline diazotée comporte 3 étapes :

1° pulvérisation du mélange suivant :

- p nitraniline à 0,5% dans HcL 2N : 2 ml
- Nitrite de Sodium à 5% : 3 à 5 gouttes
- Acétate de Sodium à 20% : 8 ml

2° pulvérisation de Na_2CO_3 à 15% dans l'eau

3° renouvellement de la première pulvérisation

(éventuellement : exposition 1 à 2 mn aux vapeurs ammoniacales).

Le tableau 8 résume les résultats.

Tableau 8 - Evolution des révélations après les différentes pulvérisations de la p. nitraniline.

Phénols déposés	UV avant révélation	1ère pulv.	2ème pulv.	3ème pulv.
Ac. chlorogénique	Bleu	Jaune	Orangé	Jaune
Rutine	Brun/jaune	Jaune	Jaune foncé	Jaune foncé
Ac. o. proto-catéchique	Bleu	Rose orangé	Rose orangé à brun plus net	Rose orangé
Ac. cinnamique	non révélé	non révélé	non révélé	non révélé
Ac. sinapique	Bleu	Orange	Jaune à rouge orangé	Jaune net Jaune orangé
Ac. isoférulique	Bleu pâle	Rose orangé	Rouge orangé	Rouge brun
Ac. férulique	Bleu	Jaune faible	Jaune net	Jaune vert
Ac. caféique	Bleu clair	Orangé	Brun	Brun jaune
Ac. proto-catéchique	non révélé	Orangé	Brun orangé	Violet brun
Ac. p.coumarique	faible	Jaune faible	Jaune faible	Vert faible
Ac. o.coumarique	Bleu très brillant	Jaune faible	Orangé à gris bleu	Rouge à mauve
Ac. p. hydroxy-benzoïque	non révélé	non révélé	Jaune faible	Orangé net
Ac. Vanilique	Non révélé	Jaune (avec un halot mauve	Jaune (avec un halot mauve	Brun rouge
Ac. gentisique	Bleu brillant	Mauve	Mauve	Blanc
Ac. Syringique	non révélé	Orangé	Orangé	Brun foncé

Le vanadate est pulvérisé à la concentration de 0,25% dans l'acide perchlorique. Les plaques sont ensuite chauffées 5 mn à 100°C.

Le tableau 9 résume les résultats observés.

Tableau 9 - Evolution de la réaction colorée avec le vanadate.

Phénols déposés	visible	U.V.	vanadate	vanadate + 100°C
Ac. Chlorogénique	Jaune	Bleu	Brun	Brun
Rutine	Jaune	Brun-Jaune	Brun	Brun
Ac. o. proto-catéchique	Jaune orangé	Bleu	Brun jaune	Brun jaune
Ac. cinnamique	non	non	non	Brun
Ac. sinapique	non	Bleu à rose très faible	Brun orangé	Brun orangé
Ac. férulique	non	Bleu	Brun	Brun
Ac. caféique	Jaune orangé	Bleu	Brun	Brun
Ac. proto-catéchique	non	non	Jaune	Jaune
Ac. p.coumarique	non	très faible	Brun verdâtre	Brun verd.
Ac. o.coumarique	non	Bleu ou blanche très brillant	Brun	Brun
Ac. p. hydroxy-benzoïque	non	non	Jaune	Jaune

Le réactif de Bénédikt permet d'identifier les ortho diphénols (acides caféiques, chlorogénique) qui perdent leur fluorescence en UV après pulvérisation.

Les dérivés phénoliques peuvent toutefois être révélés avec une très grande reproductibilité grâce à leur absorbance directe en ultra-violets d'après le principe de la spectrophotométrie en phase solide (Bounias, 1969).

Une étude systématique des spectres d'absorption comparés en phase solide et en phase liquide est en cours pour une large gamme de composants. La figure 4 en illustre un exemple.

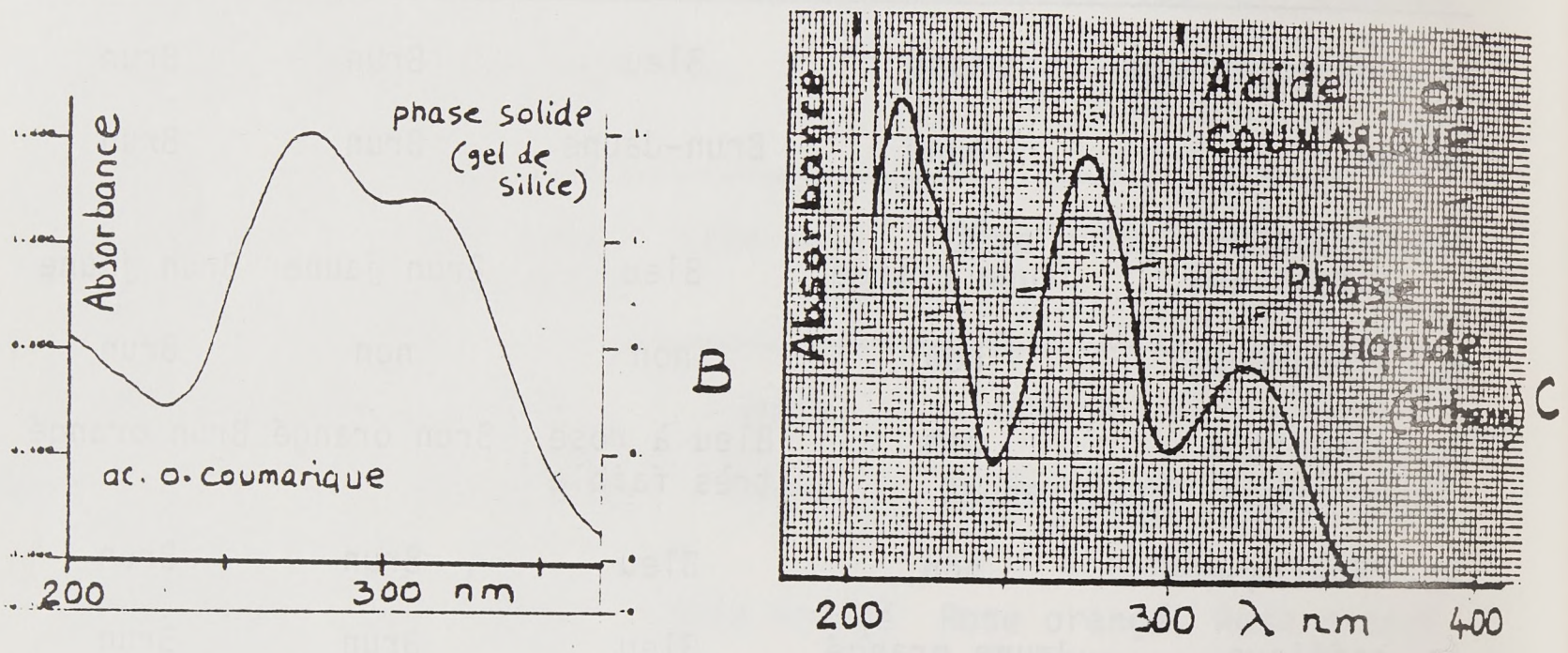


Fig. 4 - Spectres UV comparés de l'acide o. coumarique en phase solide (A) et en phase liquide (B)(éthanol).

B - Interactions pathologiques avec la Photosynthèse chez Capsicum annuum infesté par Phytophthora capsici.

Le travail présenté ci-dessous constitue une première ouverture. Il sera complété ultérieurement avec les résultats obtenus après traitement des plants par pulvérisation de tris-o.éthyl phosphite d'aluminium, (EPAL) dont les propriétés de stimulation de résistance de l'hôte au mildiou ont déjà été caractérisées précédemment.

Au cours de l'année, un travail de synthèse a été établi sur les réactions comparées de l'équipement photosynthétique des variétés sensibles et résistantes à l'action du mildiou, d'une virose

(avec étude de la systémie) et de l'EPAL. Sa publication devrait avoir lieu en 1987.

Les recherches sur l'interaction de l'EPAL et des phosphatases, qui ont donné lieu à l'apparition de phénomènes de régulation biphasiques, seront poursuivies dès la mise au point des théories en cours d'élaboration sur ce phénomène.

C.R. Colloque de Photosynthèse. Dédié à la Mémoire de M. Eugène ROUX INSTN, Saclay, 24-25 Avril 1986

CORRELATIONS ENTRE ATP/ADP ET CHLOROPHYLLES, AU COURS D'INTERACTIONS PATHOLOGIQUES ENTRE LE PIMENT (*Capsicum annuum*) ET LE MILDIOU (*Phytophthora capsici*)

R. LORIENT*, M. BOUNIAS**, C. COULOMB* et Ph. J. COULOMB*
* Laboratoire de physiologie et pathologie végétales, Université d'Avignon
Faculté des Sciences, 33, rue Pasteur, 84000 Avignon
** Laboratoire de Biochimie, INRA, Centre de Recherches d'Avignon
Domaine St Paul, BP 91, 84140 Montfavet

INTRODUCTION. Parmi les recherches consacrées aux mécanismes biochimiques de résistance des plantes à leurs parasites et pathogènes, assez peu font appel à l'étude des mécanismes photosynthétiques (1)(2). Selon certains auteurs, la photophosphorylation ne serait pas affectée par les infections de champignons ou de virus (3)(4), tandis que pour d'autres, la photophosphorylation cyclique serait altérée (5). L'analyse des relations entre les pigments chlorophylliens l'ATP et l'ADP des feuilles de variétés sensible ("yolo") et résistante ("phyo") du piment avant et après inoculation par le mycélium du mildiou montrent que les photosystèmes (PS) pourraient être impliqués dans les mécanismes associés à l'infection et à la résistance.

MATERIEL ET METHODES. Le matériel végétal, les techniques de culture et d'inoculation, ainsi que les méthodes analytiques ont été décrits ailleurs (6)(7). Les traitements sont désignés par les symboles suivants : avant (o) et après inoculation (Δ) : "Phyo" avant (□) et après inoculations (◊).

RESULTATS ET DISCUSSION. La figure 1 montre que la relation entre chlorophylles a et b est respectée au travers des divers traitements : $\rho=0,73$ ($N=10$) ; $P(\rho)=0,02$; $b=0,24$. Toutefois, l'étude des relations entre les teneurs en ATP et en chlorophylles (Chl.) a donné $\rho=0,08$ ($P=0,83$) pour la Chl. a et $\rho=0,41$ ($P=0,24$) pour la Chl. b. C'est le rapport ATP/ADP qui s'est avéré le plus étroitement corrélé aux teneurs en Chl. b ainsi qu'en phéophytines (fig. 2 et 3), tandis que la corrélation avec la Chl. a n'apparait que faiblement significative (tableau).

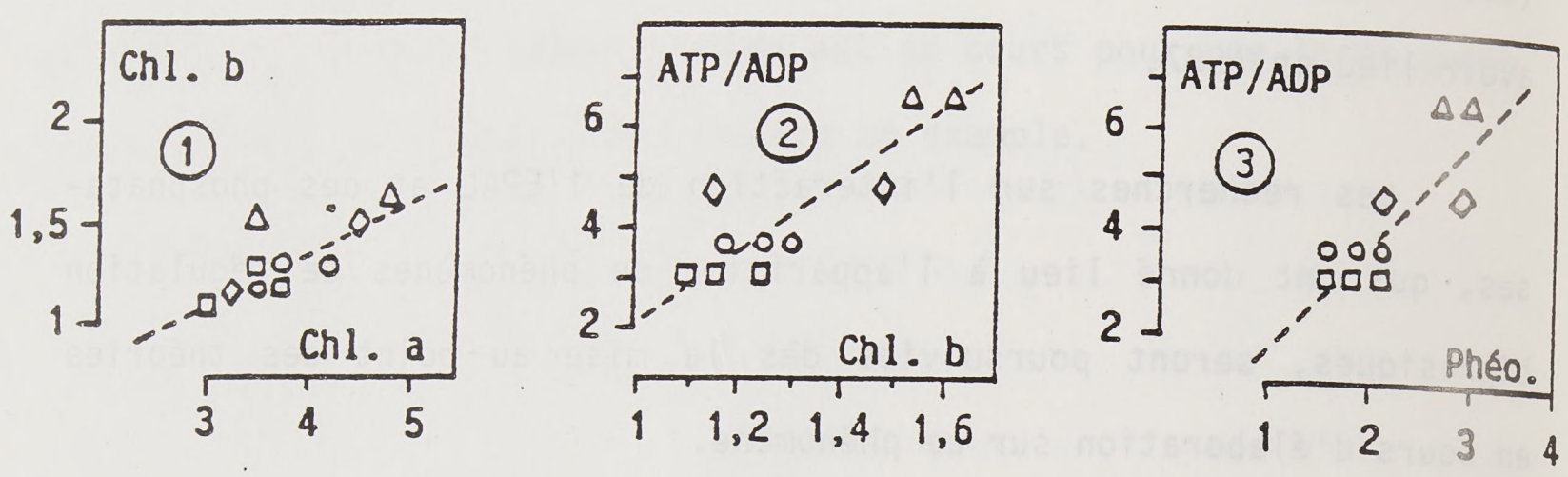


Fig. 1-2-3 - Variations du rapport ATP/ADP en fonction des concentrations en chlorophylles et phéophytines (exprimées en nmoles par mg de poids frais).

Tableau : paramètres de corrélation/régression calculés à partir de N=10 couples. Les probabilités $P(\rho)$ associées aux coefficients (ρ) ont été calculées à partir de l'équation de distribution de "t" de Student. Les écarts-types σ_b associés aux valeurs numériques des pentes de régression (b) ont été calculés à partir de la relation $\sigma_b=[(b/\rho)^2-b^2]/(N-2)$.

[ATP/ADP]/chl. a	ρ =0,441	$P(\rho)$=0,20	b=1,06	σ_b =2,37
[ATP/ADP]/chl. b	ρ =0,843	$P(\rho)$=0,002	b=6,11	σ_b =1,37
[ATP/ADP]/Phéo.	ρ =0,811	$P(\rho)$=0,004	b=2,02	σ_b =0,51

La synthèse d'ATP est l'un des premiers actes fondamentaux de la fonction photosynthétique (8)(9), mais en retour, le rapport ATP/ADP pourrait jouer un rôle important dans la répartition de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes I et II (10), bien que des doutes subsistent encore dans le cas de conditions physiologiques normales (11). Dans cette hypothèse, au cours des interactions pathologiques étudiées ici, le PS I, considéré comme le plus enrichi en Chl. a, apparaîtrait comme partiellement découplé du mécanisme régulateur agissant par phosphorylation réversible de l'antenne collectrice sous l'action d'une kinase activée par l'ATP et inhibée par l'ADP (10). En revanche, les phéophytines étant associées comme accepteur primaire "métastable" au PS II, lui-même enrichi en Chl. b (12), la corrélation conjointe de ces deux catégories de pigments avec les valeurs du rapport ATP/ADP concorde avec l'hypothèse d'une régulation normale du PS II, activé après déphosphorylation de l'antenne, correspondant à une augmentation d'ATP non utilisé. La corrélation résiduelle de faible degré relevée avec la Chl. a s'expliquerait, alors, par la présence de ce pigment dans le PS II aussi bien que dans le PS I (fig. 4). Ces observations justifient l'orientation de recherches ultérieures vers l'étude de la dissociation du fonctionnement des deux photosystèmes en relation avec la résistance des plantes à l'infection.

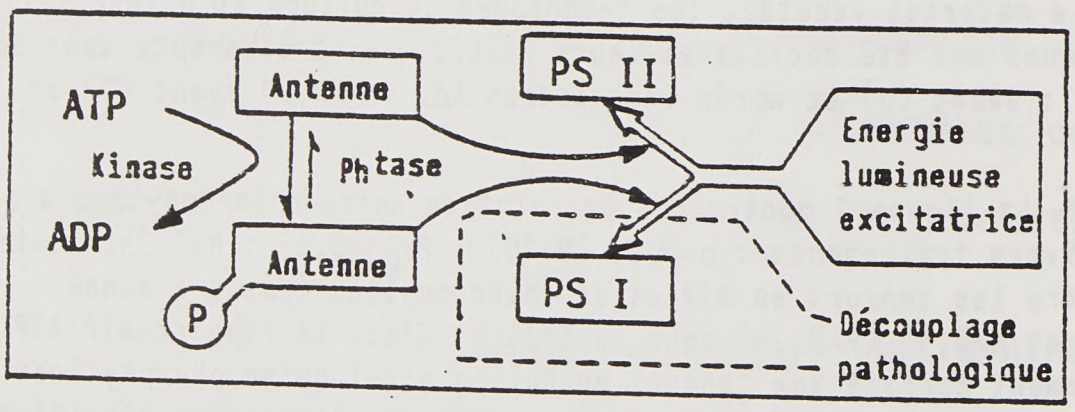


Fig. 4 - Hypothèse interprétative des résultats observés.

REFERENCES

(1) Bell, A.A., 1981 - Ann. Rev. Plant Physiol., 32, 21-81
(2) Sequeira, L., 1983 - Ann. Rev. Microbiol., 37, 51-79
(3) Goffeau, A., et Bové, J.M., 1965 - Virology, 27, 243-252
(4) Wynn, W.K., 1963 - Phytopathology, 53, 1376-1377
(5) Montalbini, P., et Buchanan, B.B., 1974 - Physiol. Plant Pathol., 4, 191-196
(6) Bounias, M., Coulomb, C., et Coulomb, Ph. J., 1984 - Can. J. Bot., 62, 1036-1043
(7) Lorient, R., 1984 - Thèse de 3e cycle, Aix-Marseille II, Fac. Sc. Avignon, 91 pp.
(8) Tyszkiewicz, E., et Roux, E., 1975 - Biochem. Biophys. Res. Comm., 65, 1400-1408
(9) Galmiche, J.M., Girault, G., Nabedryk, E., et Tyszkiewicz, E., 1981 - Echos CEA, 27-33
(10) Bennett, J., 1983 - Biochem. J., 212, 1-13
(11) Allen, J.F., 1984 - FEBS Lett., 166, 237-244
(12) Foyer, C.H., 1984 - La Photosynthèse, John Wiley & Sons, p. 31-33

IV - PROJETS DE RECHERCHES

1 - Protection de l'Abeille contre le Varroa et contre l'action des pesticides.

Les travaux préliminaires suggérant la vulnérabilité du parasite au niveau d'un système fonctionnel de cuproprotéines de types hémocyanines vont être poursuivis et approfondis, avec la mise en place d'une nouvelle équipe de recherche appelée à travailler en complète coordination, simultanément dans deux directions.

PROGRAMME BIOCHIMIQUE DE SAUVETAGE DU CHEPTEL APICOLE

(Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, Département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie)

M. BOUNIAS, D.R., Prof. associé

Le laboratoire de Biochimie propose deux directions de recherches visant à améliorer la situation actuelle de l'apiculture en ce qui concerne d'une part l'action des pesticides en général, et d'autre part l'invasion du parasite Varroa jacobsoni.

A - Traitements contre l'action des pesticides

L'utilisation d'antidotes spécifiquement administrés aux seules abeilles par l'intermédiaire des bacs de nourrissement situés à l'intérieur des rûches, permettrait d'atténuer au "coup par coup" l'impact des pesticides. Une concertation plus étroite devrait permettre aux apiculteurs d'être tenus informés par les agriculteurs de la nature et de la date des traitements effectués au voisinage des rûchers. Grâce à de légères adaptations à la structures des rûches, les antidotes pourraient être alors sélectionnés et administrés dans des délais très courts, et de manière soit préventive soit curative.

L'étude du mode d'interaction des substances antagonistes des pesticides s'effectuerait au laboratoire en collaboration avec les firmes productrices de matières actives.

L'étude des interactions moléculaires thanatologiques et cryptotoxicologiques (1), entre classes de pesticides (exemple: insecticides, acaricides et fongicides seuls et associés) couplée

à celle d'antagonistes et d'inducteurs de résistance) devrait amener, à assez brève échéance, la possibilité d'améliorer substantiellement la situation actuelle , y compris au niveau des effets secondaires des traitements actuels contre le parasite Varroa jacobsoni.

B - Lutte spécifique contre le parasite Varroa jacobsoni.

Le Varroa jacobsoni apparenté aux acariens*, fait partie des Chélicérates dont l'origine phylogénétique, remontant aux trilobites, laisse supposer que leurs représentants pourraient posséder des hémocyanines, pigments véhiculant l'oxygène dans l'hémolymphe de certains Arthropodes (décapodes en particulier) alors que l'oxygène accède directement aux cellules des Insectes par un réseau de trachées. Cette hypothèse a été étayée par des analyses faisant apparaître une concentration en cuivre (métal associé aux hémocyanines) jusqu'à 6 fois plus importante chez le Varroa que chez l'Abeille (2).

Le blocage des facteurs respiratoires cupro-protéiques apparaît donc comme pouvant constituer une cible spécifique, susceptible d'être atteinte par voie systémique, au moyen de substances administrées aux abeilles elles-mêmes, par la même voie que celle exposée précédemment (bacs de nourrissement). Les résultats d'expériences préliminaires ont été probants, et la recherche de substances actives est en cours, en collaboration avec le Département de Biologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Belgrade (3).

Le laboratoire de Biochimie compte poursuivre cette recherche et analyser également, sous un angle très spécialisé de toxicologie moléculaire, l'incidence éventuelle, chez l'abeille, des diverses classes de composés déjà employés, ou susceptibles de l'être, dans la lutte contre la varroatose.

* ou aux parasitiformes, mais il s'agit d'un **arachnide**

C - L'équipe de Recherche

Une équipe de trois jeunes chercheurs vient d'être mise en place/ Elle se compose de la façon suivante :

M. P. CASCINO, Ingénieur biochimiste (INSA-LYON) : interactions toxicologiques biochimiques liées aux pesticides (DEA puis thèse).

Mme M. NECTOUX, Maîtrise de Biochimie (Montpellier) : interactions toxico-parasitologiques biochimiques liées au Varroa (thèse).

M. G. GUIRAUD, Maîtrise de Biologie (Marseille) : aspects biologiques et physiologiques communs, situés à la jonction des deux programmes précédents (DEA puis thèse).

D - Moyens disponibles

Le service dispose actuellement de 37 m^2 de laboratoires, 31 m^2 de locaux mixtes bureaux/laboratoires et 47 m^2 de bureaux/bibliothèque/archives, ainsi que de l'équipement de base : spectrophotomètre, HPLC, spectrodensitomètre et applicateurs/CCM, photomètre enzymatique, ainsi que l'infrastructure minimale (sorbonne, étuve, etc ...).

Il comporte, autour du noyau de biochimie générale et théorique (M. BOUNIAS), une section de biochimie des relation hôtes/parasites (programmes associés à l'Université et aux Recherches Forestières) (avec 1 T.R. : Mme DAURADE) et une section de neurobiochimie (avec 1 I.E. : M. BELZUNCES), le secrétariat de rehcerche et la documentation bénéficiant du concours d'1 Adj. T. (Mme BARESTE). Depuis 1983, 41 publications ont été enregistrées, au crédit des résultats obtenus au laboratoire de Biochimie dont le rayonnement international s'est manifesté par divers programmes en collaboration avec l'Angleterre, la Pologne, la Yougoslavie et actuellement l'Allemagne.

E - Moyens demandés

La mise en place du groupe "toxicologie moléculaire" avec les deux sections : "Pesticides" et "Varroa" nécessiterait dans un premier temps une impulsion matérielle minimale, comprenant, au titre de **création d'unités :**

1) 3 allocations de stages (3x1220 F. x 12 mois = 43.920 F. pour 1 an : stages "conventionnés" en attente de bourses provenant d'autres sources de financement).

2) Deux appareils de première nécessité en remplacement de matériels usagés : 1 applicateur "nano volumes" : 30.000 F.
1 densitomètre pour plaques CCM : 70.000 F.

3) L'accord de principe d'accroître progressivement la surface des locaux, à partir du potentiel disponible à la station de phytopharmacie, soit jusqu'à 200 m^2 par tranches successives.

4) Des moyens nouveaux (y compris pour l'aménagement des locaux) seront demandés en faisant appel à des organismes extérieurs (Région, CEE, Professions), ainsi qu'à les A.I.P.

Références :

(1) M. BOUNIAS, B. NIZEYIMANA et C. VAGO, 1986, C.R. ACad. Sc., 303-III, 285-289.

(2) D.S. POPESKOVIĆ et S. PANTIĆ, 1984, 3e symp. internat. sur le Varroa, Split (Yougoslavie), 1 p.

(3) D.S. POPESKOVIĆ et M. BOUNIAS, 1986, C.R. Soc. Biol., sous presse (manuscrit joint en annexe)

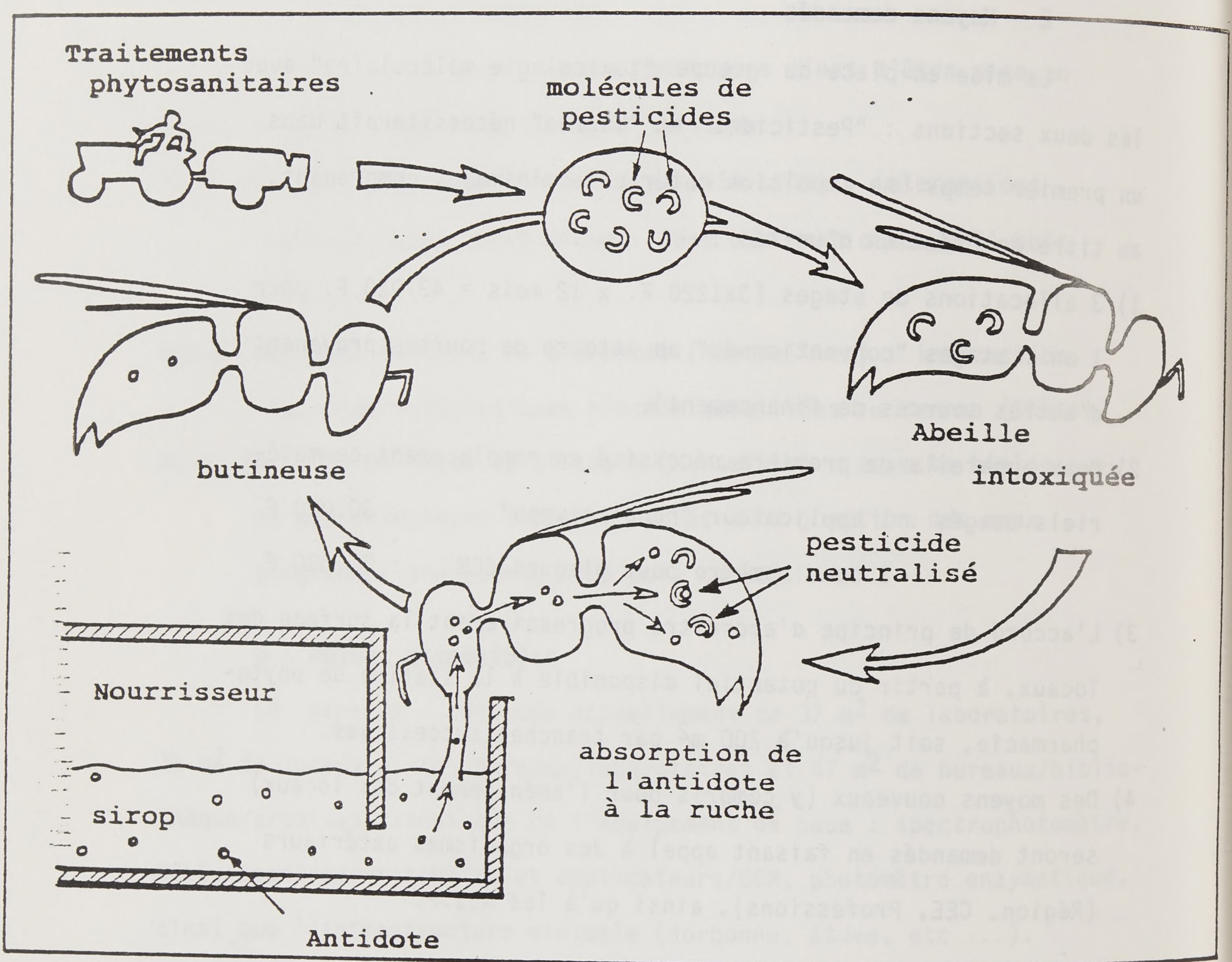


Fig. 1 - Principe du traitement spécifique de l'abeille par antidotes contre les effets non intentionnels des pesticides (les molécules des pesticides et d'antidotes sont représentées de manière symbolique)

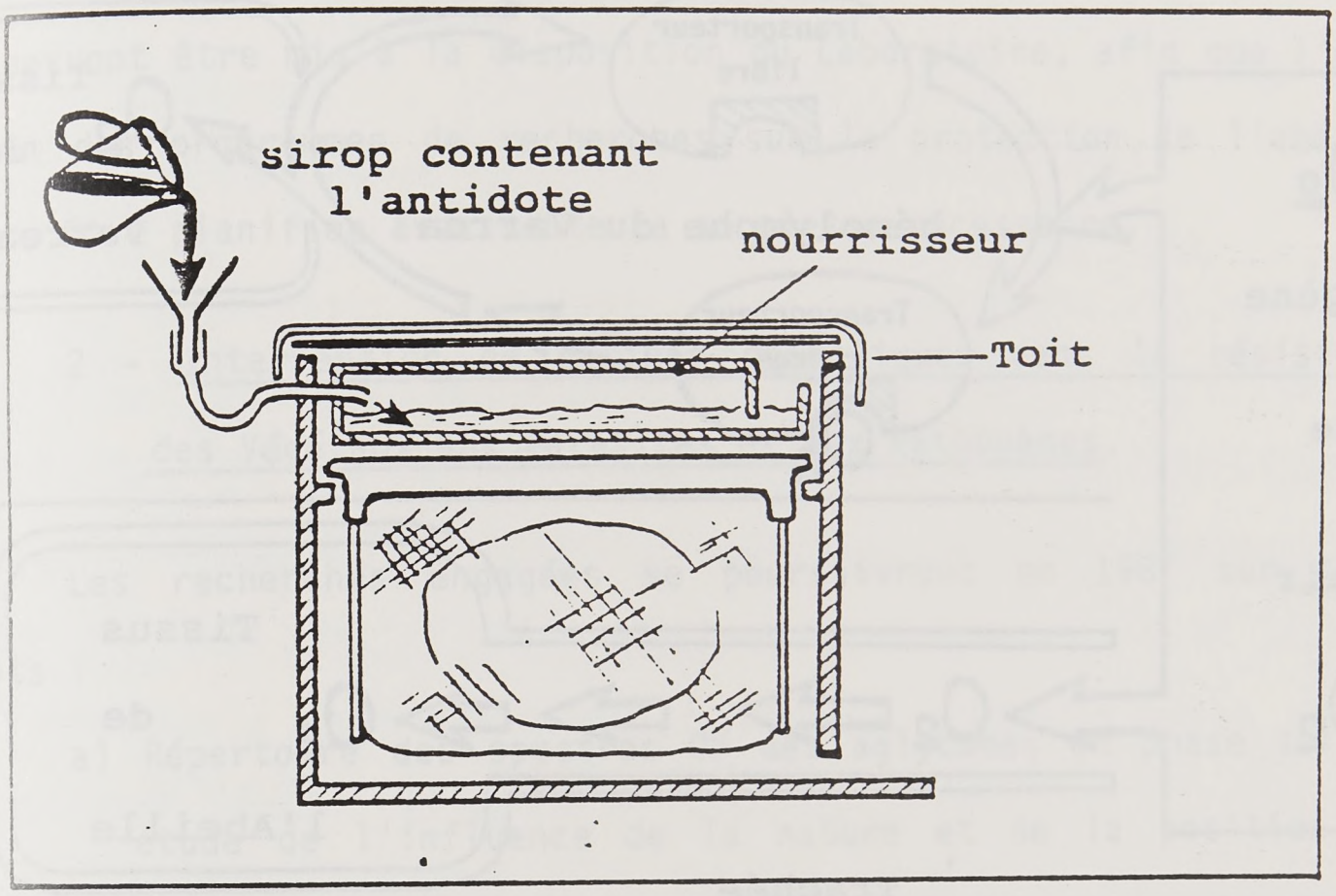
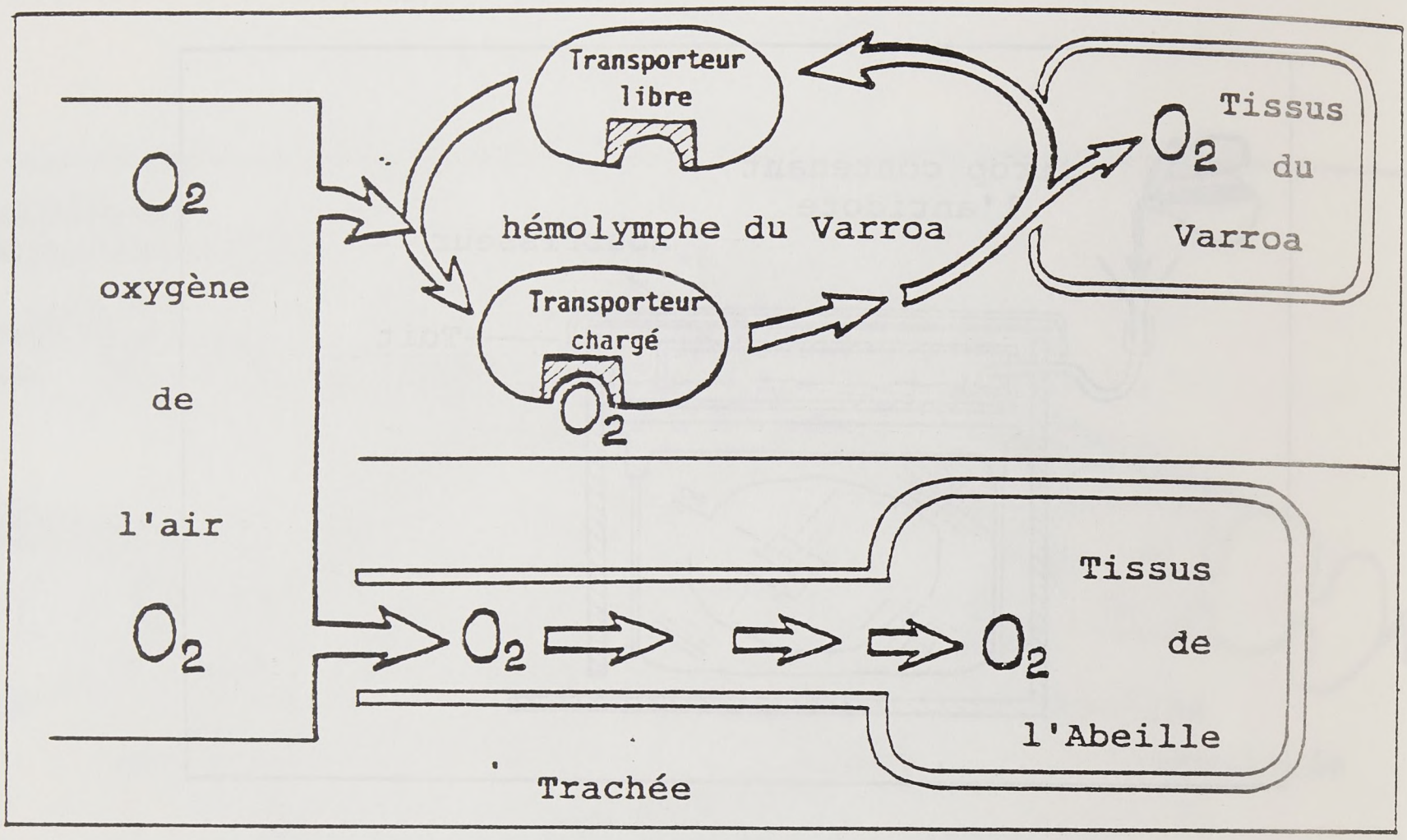


Fig. 2 - Schéma de principe d'une adaptation permettant le remplissage rapide des nourrisseurs sans ouverture des rûches



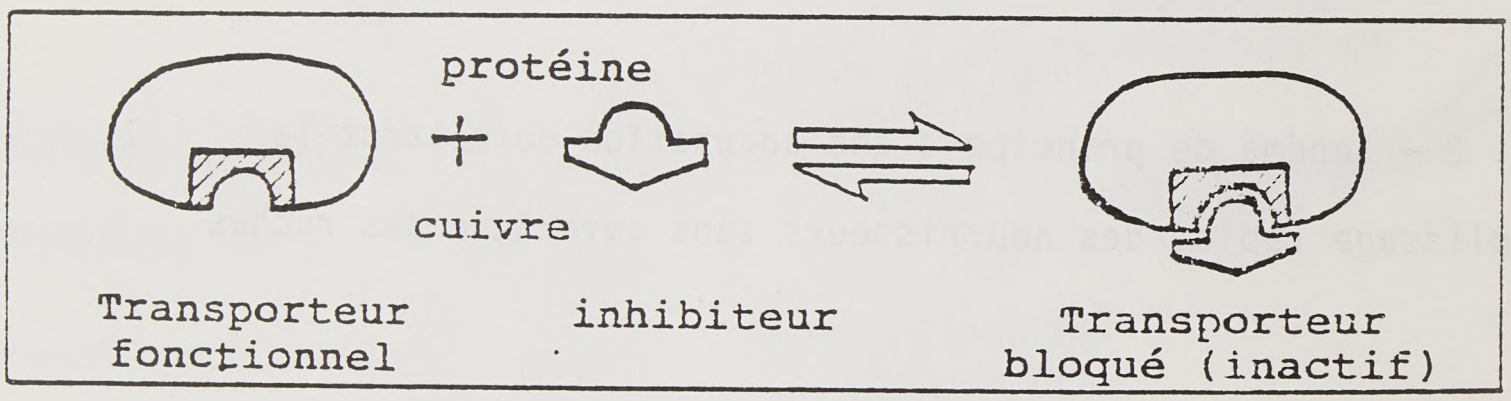


Fig. 3 - Principe de la lutte par asphyxie sélective du Varroa au moyen d'inhibiteurs des transporteurs d'oxygène propres au parasite. Ces inhibiteurs seront administrés de la même manière que les antidotes, comme indiqué sur les figures 1 et 2.

Des moyens permanents, en ruches peuplées et matériel apicole, devront être mis à la disposition du Laboratoire, afin que l'exécution des programmes de recherches sur la protection de l'abeille puisse être planifiée avec toute la souplesse nécessaire.

2 - Intervention de dérivés phénoliques dans la résistance des Végétaux aux Parasites et aux Pathogènes.

Les recherches engagées se poursuivront en 1987 sur trois fronts :

a) Répertoire des spectres UV des aglycones en phase solide: étude de l'influence de la nature et de la position des radicaux extérieurs ou chaînes latérales aux noyaux aromatiques.

b) Cinétique de réponse du Pin sylvestre aux attaques de Scolytes et champignons parasites : analyse aux temps : To + 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines, des éléments suivants:

◇ Glucides libres et conjugués (révélés au NEDIAC) et phénols libres et conjugués (UV) dans les extraits avant et après hydrolyse (chromatogrammes spécifiques des glucides et des phénols développés en parallèle).

Les analyses porteront sur des échantillons situés au voisinage des zones attaquées, ainsi que des témoins (zones saines du même arbre, arbres perforés artificiellement, arbres non traités).

Ce travail constitue la base d'un mémoire de recherche préparé par Mme Daurade.

c) Modifications des dérivés phénoliques libres et conjugués au cours de l'interaction Capsicum/Phytophthora.

Ce travail entre dans le cadre des travaux de thèse de Doctorat de M. LIZZI (Université d'Avignon).

3 - Etude Biochimique de l'action de la toxine du B.t.i. chez le Moustique.

Le travail d'analyse et d'interprétation des résultats se poursuivra, après le départ de M. Nizeyimana (rentré au Rwanda où il a obtenu un poste de Maître Assistant à l'Université Nationale du Pays) au niveau des lipides et des amino acides, puis des interactions entre glycémie, lipides et amino-acidémie. L'avancement de ce chapitre n'est freiné que par la masse de travail prioritaire (en particulier la mise en place des recherches sur la protection de l'abeille).

4 - Localisation et mode d'action biochimique des acides azélaïque et pimélique chez l'abeille isolée.

Le départ de M. Jorand "sous les drapeaux" laisse la rédaction de l'ensemble de ce travail à peine ébauchée. En fonction des "créneaux" de temps qu'il sera possible de libérer à cet effet, quelques uns des aspects les plus saillants des résultats feront l'objet d'une analyse finale et de publications.

5 - Enzymologie théorique et expérimentale.

a) Activation enzymatique. L'élaboration des équations représentatives sera poursuivie au niveau de divers cas particuliers et de la recherche des moyens de les distinguer.

L'étude expérimentale de l'interaction entre l'insuline endogène et les tréhalases de Ténébrio sera approfondie, grâce à la collaboration du Laboratoire d'étude du Métabolisme de l'Université

de Bordeaux, dont la qualité des travaux mérite d'être soulignée.

L'ajustement des données aux diverses théories possibles constituera le but ultime de cette phase des recherches.

b) Régulateurs biphasiques. L'étude des particularités algébriques de l'équation représentative du mécanisme, et celle des cas particuliers qui en dérivent, se poursuivra en 1987. Elle devrait aboutir, à terme à l'élaboration des moyens de calculer les paramètres à partir de courbes expérimentales.

c) Activation par levée d'inhibition. Ce mécanisme, dont l'utilité pratique apparaîtra au cours des recherches sur les antidotes aux pesticides fait l'objet de recherches qui se poursuivront en 1987 et 1988.

d) Analyse par compétition de substrat. Il s'agit là d'un outil technique potentiel de très grande utilité. Les bases théoriques en ont été approfondies au cours de l'automne 1986 : leur poursuite en 1987 devrait se prolonger par des applications expérimentales dans le cadre de la collaboration avec le Dr. Morgan, Chef du Département des Sciences biologiques de l'Université de Lancaster.

6 - <u>Régulation enzymatique et hormonale de la glycémie de l'abeille.</u>

Cet aspect des recherches fondamentales du Laboratoire fera, en 1987, l'objet d'une proposition internationale de jumelage, dans le cadre de la CEE, entre la France, l'Allemange et la Grande-Bretagne, soit :

France = Laboratoire de Biochimie INRA/Université d'Avignon : Service coordonnateur (Pr. M. Bounias).

Allemagne = Laboratoire de Chimie clinique, Université d'Ulm :

Prof. V. Maier

Grande-Bretagne = Laboratoire d'enzymologie, Université de Lancaster:

Dr. Morgan, Chef de Dépt.

7 - Ecotoxicologie Moléculaire chez l'Abeille.

a) l'AIP 1985 a fait l'objet d'une demande de renouvellement pour 1986 sur les bases suivantes :

A I P écotoxicologie moléculaire chez l'Abeille

M. BOUNIAS

Demande de renouvellement pour 1986.

Titre (volet 1986)

Analyse des relations biochimiques doses/effets en relation avec les concentrations intra corporelles de pesticides chez l'Abeille, in vivo, in vitro et post mortem.

Introduction

La première partie de l'A.I.P., accordée en 1986, porte sur les mécanismes de la transmission nerveuse, c'est-à-dire sur un aspect très spécifique de la toxicologie de l'Abeille, pour lequel une indispensable préparation fondamentale préalable est en cours.

Le laboratoire de Biochimie a déjà établi, par contre, au cours des dix années écoulées, un réseau très dense de données expérimentales relatives au contrôle enzymatique et hormonal des sources d'énergie biochimique de type glucidique et lipidique et à leur circulation entre les tissus de synthèse et les tissus utilisateurs, via l'hémolymphe.

Nous nous proposons donc d'explorer maintenant, comparativement les modifications apportées à ces divers mécanismes par des xénobiotiques d'origine phytopharmacologique (pesticides).

Programme de Recherches

A - Deux pesticides "x" et "y" seront choisis, en fonction des priorités économiques et toxicologiques selon l'un des deux critères suivants :

a) Interaction possible (synergie) entre deux matières actives appartenant à des familles chimiques totalement différentes.

b) Comparaison de deux matières actives ne différant que par un seul site moléculaire (relations doses/effets).

B - Leur cinétique d'action sur le transfert des glucides et lipides de l'abdomen vers les muscles thoraciques sera analysée comparativement après injection de diverses doses comprises entre DL_0 (cryptotoxicologie) et DL_{100}, sur des individus d'aspect normal, puis présentant des symptômes croissants d'intoxication, jusqu'au stade thanatologique avec suivi post mortem.

C - Parallèlement, la dynamique des matières actives et de leurs transformations seront analysées in vivo et in vitro : les cinétiques des modifications apportées par des systèmes enzymatiques constitutifs ont induits des tissus de l'Abeille seront analysées après injections dans le corps entier ou dans des préparations d'extraits tissulaires. Les modifications de diverses activités enzymatiques seront étudiées en même temps que les transformations subies par les matières actives et les données recueillies seront confrontées avec les relations doses/effets précédemment établies (§B).

Développements ultérieurs

A - Le travail devrait être étendu systématiquement à l'ensemble des principales classes de pesticides, de manière à établir de nouvelles bases toxicologiques permettant de dénouer la situation conflictuelle dans laquelle s'enfoncent actuellement de plus en plus les organismes professionnels agricoles et phytosanitaires .

B - Les mêmes démarches expérimentales devraient être étendues ensuite à l'interaction entre pesticides et pathogènes, en relation avec la station de Recherches de Pathologie Comparée de St-Christol-lès-Alès.

Travaux déjà effectués.

Les travaux fondamentaux du laboratoire relatifs à la régulation du métabolisme glucido-lipidique de l'Abeille ont été couronnés par l'Académie des Sciences en 1985, et leurs diverses applications considérées comme particulièrement marquantes, ont valu à leur auteur un siège de Membre d'honneur de l'académie de Chimie de l'Agriculture des Indes. Les mécanis-

mes d'induction ont été analysés en collaboration avec l'Université de Lancaster (GB), et une analyse des effets sublétaux d'un pyréthroïde sur la glycémie et la lipémie a été conduite en collaboration avec l'Université de Belgrade.

L'utilisation de relations biochimiques fonctionnelles comme indice traumatique chez les Végétaux (Bounias, 1972 : Thèse de Doctorat d'Etat ès Sc.) a été explorée, et son efficacité largement confirmée chez un insecte (Aedes aegypti) soumis à la δ-endotoxine du B.T.i (Thèse préparée au LBC par M. NIZEYIMANA). Enfin, le concept de "cryptotoxicologie", établi sur la base de l'ensemble des travaux précédents, vient d'être officiellement présenté à l'Académie des Sciences, en collaboration avec le Professeur VAGO, Membre de l'Institut.

Références récentes :

n°88 - BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIC D. - 1984 - Effects of subléthal doses of a synthetic pyrethroïd : deltamethrin, on the glycemia, the lipémia, and the gut alk. phosphatases of the honeybee. Pestic. Biochem. Physiol., 24(2), 149-160

n° 103 - BOUNIAS M. - 1986 - Control by aminergic and peptidergic hormones of the relationships between haemolymph lipids and carbohydrates in the honeybee. C.R. Colloq. Internat. "Invertebr. Peptides and Amines". Bordeaux 16-18 Avril, Publ. by Cambridge University Press Ed.

n° 110 - NIZEYIMANA B., VIVARES C.P., BOUNIAS M. - 1986 - Biochemical mode of action of Bacillus thuringiensis israëlensis δ-endotoxin on Aedes aegypti larva (Diptera). In : Recent Adv. in Invert. Pathol. and Microb." : Proc. IVth Internat. Colloq. on Invert. Pathol., Aug. 18-22, Veldhoven, The Netherlands, 1 p.

n° 111 - BOUNIAS M., NIZEYIMANA B. & VAGO C. - 1986 - Etude de l'action de la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le Diptère Aedes aegypti. C.R. Acad. Sci., Sér. III, sous presse

n° 112 - NIZEYIMANA B. & BOUNIAS M. - 1986 - Manifestations biochimiques de l'intoxication de larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de bacillus thuringiensis israëlensis. I - Les glucides de l'hémolymphe. C.R. Soc. Biol., sous presse.

Collaborations

- Station de Zoologie (Avignon) : fourniture d'Abeilles
- Université de Bordeaux : fourniture d'hormones endogènes d'Abeilles pour épreuves fonctionnelles

Moyens demandés (LBC)

◊ 1 bourse d'accueil pour un thésard (Doctorat ès Sciences)(voir M.A., Direction de la Qualité : AD/ES/SPV 860262)

◊ 1 équipement pour chromatographie sur couche mince à haute pression ..... 70.000 F.

◊ 1 équipement pour ultra purification de l'eau ..... 50.000 F.

◊ 1 enregistreur de radio-activité pour couche mince, destiné à l'étude des transformations et du métabolisme de pesticides marqués au ^{14}C ou au tritium ..... 200.000 F.

b) Le projet d'ATP régionale refusé en 1986 a été réorienté et présenté, au titre de 1987, sous la forme ci-dessous.

INRA - AVIGNON Convention INRA/PACA

Projet pour la Région PACA (et ATP régionales)

présenté par le laboratoire de Biochimie
(station de Phytopharmacie) au titre de 1987

Responsable scientifique : Dr. M. BOUNIAS, DR

Titre du projet : Recherches toxicologiques sur l'action comparée des insecticides au niveau du métabolisme glucido-lipidique de l'Abeille

Titre abrégé : toxicologie biochimique chez l'Abeille

(projet nouveau)

MOTIVATIONS (rappel)

Depuis quelques années, des dépérissements de plus en plus importants sont constatés dans les rûchers de la plupart des zones agricoles

de plaine, en France, tandis que les secteurs de montagne, moins exposés aux traitement agrochimiques, paraîssent davantage épargnés. D'importants procès en cours témoignent de la gravité du problème non seulement sous l'angle économique, mais également sous l'aspect des expertises, qui ne sont que très exceptionnellement en mesure de retrouver des résidus non dégradés de pesticides en quantités significatives.

OBJECTIFS - Les capacités de travail de l'Abeille sont tributaires de la bonne utilisation de ses ressources énergétiques (1). L'activité pollinisatrice est donc assujettie à la régulation du métabolisme glucido-lipidique par un certain nombre d'hormones dont le mode d'action a été progressivement mis en évidence au cours des dernières années (2)(3)(4).

Les recherches entreprises ont donc pour objet d'analyser l'action de doses croissantes des pesticides auxquels l'Abeille est le plus largement exposée sur le transfert des sources d'énergie glucidique et lipidique de l'abdomen aux muscles thoraciques. En fonction des résultats, des épreuves fonctionnelles seront mises en oeuvre afin de permettre l'étude des interactions directes éventuelles entre les pesticides et certains récepteurs hormonaux.

ETAT D'AVANCEMENT - RESULTATS DEJA OBTENUS - a) Une étude de l'action de la deltaméthrine à très faible dose (0,1 picomole par individu) a déjà permis de mettre en évidence de très importantes perturbations du métabolisme lipidique. b) D'autre part, l'utilisation de relations fonctionnelles pour la détermination des singularités susceptibles d'apparaître dans les relations doses/effets, a été éprouvée avec succès lors de recherches sur l'action de la toxine du B. thuringiensis chez A. aegypti L. (5). De là est issu le concept de crypto-toxicologie dont l'application pourrait être déterminante dans le cas des problèmes relatifs à l'Abeille.

PROGRAMME DE RECHERCHES

La phase actuelle des recherches comporte les étapes suivantes :

1) Recherches sur l'interaction d'analogues stériques des effecteurs aminergiques (type chlordimeform) avec les récepteurs de type α ou β : analyse cinétique de la glycémie après injections de doses croissantes.
2) Interaction des pesticides de la famille ci-dessus avec la deltamethrine à faible dose.

Les phases ultérieures seront étendues à la comparaison des effets des représentants les plus massivement employés des diverses catégories de pesticides et de leurs interactions (pyréthroïdes/fongicides, en particulier)

Les glucides et les lipides seront extraits et analysés au moyen des méthodes chromatographiques dont dispose actuellement le laboratoire, et qui devraient être développées ensuite dans deux directions précises, après acquisition des équipements nécessaires.

a) utilisation de dispositifs à haute pression d'élution destinés à accélérer le développement en couche mince.

b) utilisation de dispositifs radiochromatographiques permettant l'utilisation de traceurs radioactifs.

STATIONS CONCERNEES - COLLABORATION

Station de Phytopharmacie : laboratoire de Biochimie (maître d'oeuvre)
Station de Zoologie : fourniture d'Abeilles

DUREE : 1ère phase : 1 an

MOTS CLES : Biochimie toxicologique - Abeille - Glucides - Lipides - Hormones - Insecticides

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BOUNIAS M., DUJIN N. & POPESKOVIĆ D. - 1984 - Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroid : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alk. phosphatases of the honeybee. Pestic. Biochem. Physiol., 24(2), 149-160

(2) BOUNIAS M. - 1981 - Blood sugar levels in worker honeybees of different races as an index of their honey production. J. Apic. Res., 20(4), 215-220

(3) BOUNIAS M. & PACHECO H. - 1979 - Sensibilité de la glycémie de l'Abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés in vivo. C.R. Acad. Sci., 289D, 201-204

(4) BOUNIAS M. - 1980 - Cinétiques d'action de la nor-adrénaline, de la dopa et de la dopamine sur la glycémie de l'Abeille in vivo. Arch. Internat. Biochem. Physiol. (LIEGE), 88(1), 93-98

(5) BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1985 - Effects of honeybee insulin-immunoreactive peptide on the honeybee haemolymph lipid and carbohydrate : interaction of vertebrate somatostatin. Insect Biochem., 16(4), 721-731

(6) BOUNIAS M., NIZEYIMANA B. & VAGO C. - 1986 - Etude de l'action de la δ-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le diptère Aedes aegypti. C.R. Acad. Sci., sér. III, 303(7), 285-289

DEMANDE DE FINANCEMENT

A - Laboratoire de Biochimie

Fonctionnement : achat de molécules-étalons
verrerie spécialisée, microseringues
fournitures pour photomètres
filtres pour sorbonne de paillasse ... Total : 25.000 F.

Equipement : l'un des photomètres du laboratoire (VERNON PHI5) *
âgé de 13 ans et accusant un très grand nombre d'heures de fonctionnement (plusieurs milliers) vient de subir coup sur coup plusieurs défaillances dont la dernière risque d'être irréparable. Il devra être remplacé par un matériel équivalent dont le choix n'est pas encore fixé, une étude comparative des caractéristiques des appareils produits par diverses firmes étant en cours.
L'ordre de grandeur du coût d'achat est de ..... 80.000 F.

Bourses : Dans un premier temps, une bourse de DEA de 2.000 F. par mois x 10 mois couvrirait le démarrage du projet 20.000 F.

* Marque disparue depuis 3 ans

Une bourse de thèse sera sollicitée ensuite, au vu des résultats obtenus.

B - Station de Zoologie

Fonctionnement : mise à disposition d'abeilles d'origine physiologique et génétique définie ..... 10.000 F.

TOTAL 1987 H.T. 135.000 F.

Deuxième Partie

I - ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

INTRODUCTION - Sur proposition de l'Université d'Avignon, le Dr. BOUNIAS a été nommé, au 1er Octobre, Professeur associé 1ère classe, sur contingent national, par arrêté n° P10113 (conjoint) des ministères de l'éducation nationale, de l'agriculture et délégué chargé de la recherche et de l'enseignement supérieur, et rémunéré à partir de cette date par le Ministère chargé de l'Enseignement supérieur. En, accord avec toutes les parties concernées, il continue à assumer pleinement ses fonctions de Direction de Recherche au Laboratoire de Biochimie. Au terme des 6 premiers mois de détachement, le gain net pour l'INRA, en termes de masse salariale, sera de : 134.017,26 F. Par ailleurs, n'aura pas à avancer les paiements correspondants en "heures complémentaires". Les enseignements se répartissent de la façon suivante.

PROGRAMME D'ENZYMOLOGIE. (20+17 heures).

Introduction : définitions et bases moléculaires de la Vie. Rappels de thermodynamique. Loi d'Arrhénius.

Rappels de cinétique chimique. Applications à l'enzymologie, détermination de l'équation de Michaelis-Menten. Influence de la concentration en enzyme, de la concentration en substrat. Propriétés, aberrations à éviter. Transformation linéaires : efficacités comparées. Action du pH : calcul des équations. Intégration de l'équation de MM. Modifications de la cinétique michaëlienne : schéma général de Botts & Morales. Inhibitions compétitive, incompétitive, mixte, (équation de CHOU)

par "excès de substrat, par excès d'enzyme.

Activation : divers cas, induction.

Régulateurs biphasiques. Cinétique à 2 substrats.

Artefacts. Activation par le substrat. Cinétiques à plusieurs composantes superposées.

Coopérativité : divers modèles et généralisations.

Calcul des paramètres non Michaëliens. Généralisation aux interactions effecteurs/récepteurs/transporteurs.

PROGRAMME DE TOXICOLOGIE (38 heures).

Introduction : inventaire des toxiques, classification. Voies d'accès, pharmaco-cinétique. Facteurs influençant la réponse des toxiques. Interactions toxicologiques, synergie et antagonisme, phénomènes d'enchaînements. Cibles toxicologiques : cibles hormonales chez les Insectes, ches les Végétaux ; cibles photosynthétiques ; cibles polyvalentes et multifonctionnelles : phosphorylation, systèmes AMPc/GMPc ; cibles enzymatiques : fonctions principales, et leurs antagonistes. Applications aux fonctions de lignification et de mélanisation. Relations fonctionnelles chez les Végétaux et les Insectes: applications toxicologiques et traumatologiques (Moustique, orge, medicago). Effets toxiques non intentionnels. Méthodes d'administration des toxiques (végétaux et insectes). Méthodes d'analyse des effets toxiques aux niveaux Biologique, Physiologique et Biochimique. Relations doses/effets.

PROGRAMME DE STATISTIQUES BIOLOGIQUES (12 heures).

Distribution et nature des variables biologiques. Calcul de la moyenne et de l'écart-type : justification de leur validité. Coefficient de variation. Distribution d'une moyenne intervalle de confiance. Concept de risque. Comparaison des moyennes. Significa-

tion des tables de distribution de ε et de t. Comparaison des variances. Corrélation et régression linéaires. Analyse de variance à 1 et à 2 facteurs contrôlés.

La rédaction d'un fascicule (manuel de cours) est prévue, à terme, dans chacune des matières, en préalable à la rédaction d'un ouvrage d'enzymologie et d'un autre de toxicologie intégrant les données nouvelles acquises dans la littérature et au Laboratoire au cours des dernières années.

Le conseil de l'Université a proposé le renouvellement de la nomination pour l'année universitaire complète 1987-1988.

II - ACTIVITES ANNEXES

a) Nomination (F.I.S.A.C.)

Le Pr. M. BOUNIAS a été élu Membre honoraire de l'Académie des Chimistes de l'Agriculture des Indes ("Hon. Fellow and Hon. Member"). La lettre d'accompagnement, du 10.04.86 précise : "The fellowship has been awarded to you for your outstanding contributions in Applied Biochemistry".

b) Conseil Scientifique PNRL

Les fonctions de Conseiller Scientifique du PNR du Luberon n'ont donné lieu qu'à un nombre réduit de séances de travail en 86.

c) Promotion de la langue française scientifique

L'évaluation puis la traduction en Français de manuscrits originaux initialement rédigés en anglais par des équipes étrangères a été entreprise dans le cadre d'une relance, par la Société de Biologie (Collège de France), de l'usage international de la langue française comme mode d'expression scientifique.

d) Mission à l'Etranger

M. BOUNIAS a été invité officiellement, comme Professeur associé, par les autorités de Belgrade pour représenter la France lors des cérémonies de célébration du 50e anniversaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire. Le voyage a fourni, par ailleurs, l'occasion de faire le point sur l'ensemble des collaborations en cours, et en particulier sur les recherches concernant le Varroa.

Troisième Partie

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - BILAN BUDGETAIRE 1986

Le tableau ci-dessous précise la répartition des diverses catégories de dépenses.

La dotation initiale était la suivante	:	156.130,00 F.
Déficit fonctionnement 1985	: -	26.300,00 F.
Cession Orléans	:	22.100,00 F.
Crédit téléphone	:	2.280,00 F.
Crédit Formation Permanente	:	850,00 F.

Dépenses effectuées pour l'année 1986 :

606-3(1)	Fournit. Entr. Petit Mat. equip.	:	18.059,30 F.
606-3(2)	Prod. Chimiques	:	12.420,78 F.
606-4	Fourn. Adm.	:	14.188,51 F.
615-54	Entret. Rép. Mob. Mat.	:	10.915,36 F.
618-3	Doc. Techn.	:	24.203,80 F.
625-11	Déplac. en France	:	15.175,98 F.
626	Affranchissements	:	5.845,35 F.
628-28	Charges Ext. Div.	:	9.744,73 F.
	XEROX Serv. génér.	:	11.121,20 F.
	Téléphone	:	5.629,93 F.
	Mme Quiros (Femme de ménage)	:	8.091,98 F.
	T.U.C.	:	1.500,00 F.
	Stagiaires	:	1.093,33 F.
218-310	Matériel de Bureau	:	10.855,00 F.
220-400	Mobilier	:	10.738,17 F.
215-420	Matériel Scientifique	:	144.795,25 F.
	Total	:	304.378,67 F.

II - EFFECTIFS DU LABORATOIRE

Au 31 décembre 1986, les effectifs se présentent comme suit:

Scientifique : Dr. M. BOUNIAS, DR., Prof., Chef de service.

Ingénieur : M. L. Belzunces, Ing. d'étude.

Technicien de la Recherche : Mme M.H. Daurade (1).

Adjoint technique : Mme N. Bareste (2), secrétariat de Recherche.

Chercheurs associés universitaires :

- Mme M. Nectoux (thèse, Univ. Montpellier)
- M. P. Cascino (DEA puis thèse, Marseille St-Charles)
- M. G. Guiraud (DEA puis thèse, Marseille St-Jérôme)

NB : Au moins un chercheur sabbatique étranger de haut niveau est attendu, suite aux demandes formulées depuis 1985 et renouvelées en 1986

Soit au total : 7 personnes à plein temps.

III - PERSPECTIVES 1987.

Il convient d'attirer l'attention sur l'aggravation prévisible à court terme du manque de moyens dont souffre déjà le laboratoire, et qui apparaît comme fortement disproportionné à ses prestations. Or, la mise en route de nouveaux programmes de toxicologie de l'abeille répond à un besoin pressant au niveau de la Profession : il convient de lui donner suite et d'y adapter les infrastructures du laboratoire.

A - L'équipement devrait être amélioré sous deux aspects :

a) <u>Appareils à remplacer d'urgence</u>.

- 1 étuve inox pour chromatographie : 7.000 F.
  (la seule du Laboratoire, déjà réparée, sera complètement hors d'usage à brève échéance du fait d'une corrosion excessive)

- 1 bain thermostaté : 8.000 F.
  (le seul du Laboratoire est en panne)
- 1 densitomètre-CCM : 90.000 F. environ
  (le PHI-5 Vernon est de nouveau en panne et il s'avère quasi impossible de trouver les pièces de rechange)
- 1 centrifugeuse de table petite capacité : 5.000 F. env.
  (la T-5 Janetzki donne des signes d'usure définitive dans la fixation du rotor. La TH12 est irréparable).

b) Appareils de nécessité élémentaire.

- Petites fournitures : verrerie, seringues, etc : 10.000 F.
- 1 installation d'ultra purification de l'eau : 50.000 F.
- 1 thermostat à effet Peltier pour cuves enzymologiques du spectrophotomètre (évitant le danger des circulations de liquide) : 28.000 F.
- cagettes pour Abeilles (programmes de toxicologie) : 15 à 20.000 F.
- 1 applicateur pour micro-dépôts quantitatifs CCM : 25.000 F.

c) Appareils nécessaires à court terme.

- chambres d'élevage (Abeilles) et de cultures (Végétaux)
- 1 dispositif chrom-Press pour le développement de la CCM sous haute pression (gain de temps et de résolution) : 70.000 F.
- 1 lecteur de radio-acitivité pour plaques CCM : 250.000 F.
  Nécessaire pour l'utilisation de traceurs radioactifs en toxicologie biochimique et pharmacologique.

B - **Les effectifs actuels ne suffisent plus depuis longtemps.** Il est nécessaire de prévoir, dans les meilleurs délais :

- 1 poste de documentaliste (1500 pièces de correspondance sont enregistrées par an, et plus de 10.000 fiches biblio-

graphiques à établir classer et gérer, ainsi que les documents originaux correspondants)

- 1 poste de technicien de la recherche (Mme Bareste et Mme Daurade sont respectivement retenues au delà des limites possibles par le secrétariat de recherche (gestion, dactylographie, documentation) et par le programme de recherches sur la résistance des Pins sylvestres à eux seuls.
- 4 postes de chercheurs (à répartir entre scientifiques et ingénieurs) faisant suite, à terme à 3 bourses de thèses au moins, à prévoir de 1987 à 1990.
- L'informatique ne pourra être introduite au Laboratoire que si les moyens correspondants en personnels et en équipement lui sont affectés.

C - Les locaux actuels devraient être augmentés d'au moins 30 à 50 m^2.

- Les installations sont entassées et ne permettent pas de disposer de paillasses libres. En outre, certains secteurs devraient être séparés pour des raisons précises : corrosion des appareils au voisinage des zones "chimie", allergie de certains personnels aux zones de manipulations d'insectes vivants.
- L'accueil de chercheurs sabbatiques étrangers de haut niveau, et même celui de stagiaires universitaires (dont la charge est d'autant plus lourde pour le Service, que les personnels titulaires sotn en nombre très réudit) fait partie des missions de l'INRA.

Or, la place disponible ne permet plus au laboratoire d'honorer dans des conditions décentes ses engagements, dans le cadre de cette mission de collaboration internationale et de formation universitaire. Les locaux potentiellement utilisables dans la station

peuvent, heureusement, permettre l'agrandissement du Laboraotire à très court terme : il s'agit essentiellement d'une question de volonté de soutien, dont il est permis d'espérer qu'elle viendra reconnaître les services rendus au prix d'efforts et de risques considérables dans des conditions éprouvantes.

- L'extension du Laboratoire autour de son emplacement actuel avec affectation de personnels supplémentaires permettrait, en outre, de répondre à d'autres demandes émanant d'autres stations du centre d'Avignon lui-même. Parmi celles-ci, la station de Zoologie souhaite, depuis plusieurs années, développer certains aspects de la physiologie des noctuidés, par exemple, que le Laboratoire de Biochimie n'avait malheureusement pu aborder faute de moyens en personnels, alors que de telles recherches entrent, néanmoins, directement dans ses compétences.

Il paraîtrait, dès lors, judicieux de mettre en commun un certain nombre de moyens des deux départements dans le cadre de la structure spécialisée qu'est le Laboratoire de Biochimie, dont la vocation serait ainsi élargie à des programmes communs à la Phytopharmacie et à la Zoologie, à partir d'une installation de base déjà existante. Ainsi serait remise à l'ordre du jour une certaine vocation du Laboratoire à rendre service à l'échelle du Centre, ce dont il avait déjà été question voici une dizaine d'année, mais à une époque où la biochimie n'apparaissait encore, aux yeux de certains, que comme un discipline marginale.

Le 28.04.87

DR. M. BOUNIAS

Quatrième Partie

PUBLICATIONS, COLLOQUES, THESES

I - LISTE DES PUBLICATIONS PARUES EN 1986.

103 - BOUNIAS M. - 1986 - Control by aminergic and peptidergic hormones of the relationships between haemolymph lipids and carbohydrates in the honeybee. C. R. Colloque International "Invertebrate Peptides and Amines". Bordeaux 16-18 Avril, Publ. by Cambridge University Press Ed.

104 - BOUNIAS M. - 1986 - Analogie de deux effecteurs hyperglycémiants : l'AMP cyclique et le glucagon, injectés chez l'Abeille in vivo. C. R. Acad. Sci. PARIS, série III, 302(5), 141-144

105 - BOUNIAS M. - 1986 - Modification de la lipémie de l'Abeille sous l'action de l'AMP cyclique et du glucagon injectés in vivo, seuls ou en présence de somatostatine. Communication à la séance du 21/01/86, Soc. Biol. Montpellier (Centre CNRS) C. R. Soc. Biol., 180(1), 77-88

106 - BOUNIAS M. - 1986 - Intéraction agonistes et antagonistes de quelques effecteurs peptidergiques et aminergiques sur la lipémie de l'abeille in vivo C. R. Soc. Biol., 180(1), 89-97

107 - BOUNIAS M. - 1986 - Noradrenaline, propranolol and adrenochrome interactions with the dynamic of haemolymph lipids in worker honeybees. Hormone and Metabolic Research, 18(12), 804-810

108 - LORIENT R., BOUNIAS M., COULOMB C. & Ph. J. COULOMB - 1986 - Corrélations entre ATP/ADP et Chlorophylles, au cours d'interactions pathologiques entre le piment (Capsicum annuum) et le mildiou (Phytophthora capsici) C. R. Colloque de Photosynthèse. Dédié à la Mémoire de M. Eugène ROUX INSTN, Saclay, 24-25 Avril 1986

109 - VIVARES C.P., BOULBES-DACLINAT B. & BOUNIAS M. - 1986 - Comparative effects of starvation and chlamydian disease on haemolymph and fat body lipids and carbohydrates in Gryllus bimaculatus (Orthoptera). In : "Recent Adv. Invert. Pathol. & Microbial". - Proc. IVth Internat. Colloq. Invert. Pathol., Aug. 18-22, 1986, Veldhoven, The Netherlands, 1 p.

110 - MIZEYIMANA B., VIVARES C.P. & BOUNIAS M. - 1986 - Biochemical mode of action of Bacillus thuringiensis israëlensis delta-endotoxin on Aedesaegypti larva (Diptera). In : Recent Adv. in Invert. Pathol and Microbial" : Proc. IVth Internat. Colloq. on Invert. Pathol., Aug. 18-22, 1986, Veldhoven, The Netherlands, 1 p.

111 - BOUNIAS M., NIZEYIMANA B., VAGO C. - 1986 - Etude de l'action de la delta-endotoxine de Bacillusthuringiensis israëlensis sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le Diptère Aedesaegypti. C.R. Acad. Sci., sér. III, 303(7), 285-289

112 - NIZEYIMANA B., BOUNIAS M. & VIVARES C.P. - 1986 - Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de Aedes aegypti (Insecte, Diptère), par la delta-endotoxine de Bacillus thuringiensis israëlensis. I - Les glucides de l'hémolymphe. C.R. Soc. Biol., 180, 551-563

113 - BOUNIAS M. - 1986 - Détermination des constantes cinétiques dans le cas général d'enzymes de type coopératif ou michaëlien inhibées par leur substrat : analyse théorique. C.R. Acad. Sci. (Paris), sér. III, 303(12), 495-500

114 - BAHJOU A., MOREAU R., BOUNIAS M., GOURDOUX L. & DUTRIEU J. - 1986 - Interaction moléculaire in vitro d'une substance apparentée à l'insuline avec l'activité tréhalasique du corps gras du coléoptère Tenebrio molitor L. . C.R. Acad. Sc. (Paris), sér. III, 303(16), 655-660

115 - BOUNIAS M. - 1986 - Etude cinétique de la glycémie de l'abeille après injection de dl-octopamine in vivo. C.R. Soc. Biol., 180( ), 512-519

116 - FREROT B. & BOUNIAS M. - 1986 - Identification of the main carbohydrate of Pinus sylvestri phloem.-studies on the variations of two clones. First International Meeting of the IUFRO working party on plant resistance mechanisms to insects and pathogen. Aug. 26-29, 1986

II - RECAPITULATION DES COMMUNICATIONS EN COLLOQUES.

- Colloque International "Invertebrate Peptides and Amines". Bordeaux 16-18 Avril. Communication de M. BOUNIAS.

- Colloque de la Société de Biologie, CNRS, Montpellier. Montpellier 21 Janvier. Communication de M. BOUNIAS.

- Colloque de Photosynthèse. Dédié à la Mémoire de Eugène Roux
INSTN, Saclay 24-25 Avril. Communications de R. LORIENT, M. BOUNIAS, C. COULOMB et Ph.J. COULOMB.

- 4ème Colloque International "Invertebrate Pathology". Veldhoven, The Netherland, 18-22 Août. Communication de C.P. VIVARES, B. BOULBES-DACLINAT et M. BOUNIAS.

- 4ème Colloque International "Invertebrate Pathology. Vel dhoven 18-22 Août. Communication de B. NIZEYIMANA, C.P. VIVARES et M. BOUNIAS.

- 1er Colloque INternational "IUFRO Working party on plant resistance mechanisms to insects and pathogen. 26-29 Août. Communication de B. FREROT et M. BOUNIAS.

III - SOUTENANCE DE THESES.

- A. BENKAI, 1986 : Métabolisme glucidique et lipidique du criquet migrateur : effets comparés des hormones des corpora cardiaca et d'un peptide extrait du mésentéron. Université de Bordeaux I. Jury : Mlle J. DUTRIEU, M. BOUNIAS, A. GIRARDIE, R. MOREAU.

- A. BAHJOU, 1986 : Le métabolisme du corps gras in vitro de Tenebrio molitor : effets de deux types d'hormones. Université de Bordeaux I. Jury : Mlle J. DUTRIEU, M. BOUNIAS, A. GIRARDIE, L. GOURDOUX.